

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Etude génétique et cytologique de populations de palourdes asiatiques invasives (Corbicula spp.)

Etoundi, Emilie

Award date:
2011

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET CYTOLOGIQUE DE POPULATIONS DE PALOURDES
ASIATIQUES INVASIVES (*CORBICULA* SPP.)**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Emilie ETOUNDI

Janvier 2011

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude génétique et cytologique de populations de palourdes asiatiques invasives (*Corbicula* spp.)

ETOUNDI Emilie

Résumé

Natives d'Asie, d'Afrique, du Moyen-Orient et d'Australie, les palourdes asiatiques de genre *Corbicula* comptent parmi les bivalves les plus invasifs en Europe et en Amérique. Le genre a été décrit pour la première fois en Europe dans les années 1980 et en Amérique dans les années 1920. Dans leur aire d'invasion, ces palourdes ont des impacts écologiques et économiques énormes, telles que des dégâts aux installations industrielles, des perturbations des réseaux trophiques et une compétition avec les espèces natives.

Jusqu'à aujourd'hui, il y avait peu d'indication sur quelles espèces avaient envahi l'Europe, leur point d'entrée et leurs routes d'invasions. En outre, la taxonomie du genre *Corbicula* est très controversée, principalement à cause d'une forte plasticité phénotypique et d'un mode de reproduction unique chez certaines lignées, l'androgenèse.

L'androgenèse est une forme de reproduction unisexuée qui correspond à une hérédité paternelle stricte. Après la fécondation d'un ovule par un spermatozoïde non-réduit et biflagellé, les chromosomes maternels sont expulsés sous forme de deux globules polaires mais les mitochondries sont retenues dans le cytoplasme. Le sperme androgénétique peut aussi parasiter des oocytes de lignées de *Corbicula* différentes, ceci pouvant être vu comme une sorte de parasitisme des œufs. Ce phénomène résulte en une disjonction entre les lignées nucléaires et mitochondriales, ainsi qu'entre la morphologie et l'haplotype mitochondrial.

Cette étude est la première à se focaliser de manière globale sur le genre *Corbicula* en Europe.

Par une approche intégrative combinant analyses morphologiques, séquençage des gènes mitochondriaux COI et Cytb ainsi que génotypage au moyen de marqueurs microsatellites, nous avons pu clarifier la systématique du genre *Corbicula* en Europe et pouvons affirmer que seules trois lignées ne représentant qu'une très petite partie de la diversité native ont envahi notre continent. Ces lignées sont similaires voire identiques aux palourdes invasives en Amérique et à certaines lignées asiatiques. De façon surprenante, tous les individus au sein d'une de ces lignées sont des clones parfaits. Ils partagent des génotype, haplotype mitochondrial et morphotype identiques. Parmi les différentes lignées, l'une d'elles est largement dominante tant au point de vue de son abondance que de sa distribution, cette prépondérance étant certainement liée à une plus grande capacité d'adaptation écophysiologique et à la possession d'un « General Purpose Genotype ». Cette approche

intégrative montre également que l'hybridation entre les différentes formes européennes est possible et vérifie le parasitisme des œufs.

Ce dernier phénomène ainsi que l'observation de spermatozoïdes biflagellés tendent à prouver que l'androgénèse est le mode de reproduction des lignées européennes.

Enfin, des caryotypes couplés à nos analyses des marqueurs microsatellites suggèrent que les formes européennes pourraient être triploïdes, cette triploïdie étant liée à l'androgénèse.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur: Prof. K. Van Doninck

En préambule à ce mémoire, je tiens à remercier l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes (URBO) et ses membres de m'avoir accueillie et intégrée durant l'année qui vient de s'écouler.

Au sein de cette unité, j'ai une pensée particulière pour le professeur K. Van Doninck et sa doctorante L.M. Pigneur, respectivement la promotrice et la tutrice de ce travail.

Je voudrais souligner l'agréable ambiance de travail qu'elles entretiennent au sein de leur équipe et l'oreille attentive qu'elles m'ont toujours prêtée. Je remercie la première de m'avoir poussé à élargir ma culture scientifique et de m'en avoir donné les moyens. Mais, j'aimerais surtout remercier L.M. Pigneur pour ses conseils avisés, sa disponibilité malgré un emploi du temps très chargé ainsi que l'aide apportée.

Un grand merci également à E. Falisse dont j'ai apprécié la compagnie tout au long de cette année et plus particulièrement dans les moments de découragement.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme S. Rombout de l'Institut de Pathologie et de Génétique (IPG) à Gosselies pour son aide précieuse et la disponibilité dont elle a toujours fait preuve.

Enfin, je n'oublie pas de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, que ce soit pour leur apport scientifique, moral ou rédactionnel.

Merci à toutes et à tous.



CHAPITRE 1 - INTRODUCTION ----- 4

1.	LES INVASIONS BIOLOGIQUES	4
1.1.	LES ESPÈCES INVASIVES -----	4
1.2.	INVASIONS BIOLOGIQUES ET ECOSYSTÈMES DULÇAQUICOLES -----	4
1.3.	LES BIVALVES DULÇAQUICOLES -----	5
1.4.	LE CAS DU GENRE <i>CORBICULA</i> -----	7
2.	LE GENRE <i>CORBICULA</i>, GÉNÉRALITÉS	9
2.1.	DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE -----	9
2.2.	SYSTÉMATIQUE -----	10
2.3.	MORPHOLOGIE ET ANATOMIE -----	11
2.4.	BIOLOGIE -----	12
2.5.	ÉCOLOGIE -----	13
2.6.	<i>CORBICULA</i> COMME GENRE BIOINDICATEUR -----	15
3.	<i>CORBICULA</i>, UNE REPRODUCTION ATYPIQUE	16
3.1.	STRATÉGIES REPRODUCTIVES -----	16
3.2.	MORPHOLOGIE FONCTIONNELLE REPRODUCTIVE ET GAMETOGENÈSE CHEZ LES ESPÈCES HERMAPHRODITES -----	16
3.3.	CYCLE DE VIE DES ESPÈCES VIVIPARES -----	17
3.4.	REPRODUCTION UNISEXUÉE -----	18
3.5.	ANDROGENÈSE -----	19
3.6.	ANDROGENÈSE ET SYSTÉMATIQUE -----	20
3.7.	SPERMATOZOÏDE BIFLAGELLE NON REDUIT -----	21
4.	POLYPLOÏDIE	22
4.1.	POLYPLOÏDISATION : GÉNÉRALITÉS -----	22
4.2.	POLYPLOÏDISATION AU SEIN DU GENRE <i>CORBICULA</i> -----	22

CHAPITRE 2 - OBJECTIFS DU MÉMOIRE ----- 24



CHAPITRE 3 - MATÉRIEL ET MÉTHODES ----- 25

1.	SPÉCIMENS ÉTUDIÉS	25
2.	ANALYSES MORPHOLOGIQUES	25
3.	ISOLATION DES SPERMATOZOÏDES	26
4.	ANALYSES GÉNÉTIQUES	26
4.3.	DISSECTION-----	26
4.4.	EXTRACTION D'ADN -----	26
4.5.	AMPLIFICATION DES GÈNES CIBLES MITOCHONDRIAUX (TABLEAU 9) --	26
4.6.	ANALYSES DES SÉQUENCES -----	27
4.7.	AMPLIFICATION DES MOTIFS MICROSATELLITES (TABLEAU 10)-----	27
5.	ANALYSE DE LA PLOÏDIE	28
5.1.	CARYOTYPES -----	28

CHAPITRE 4 - RÉSULTATS ----- 30

1.	MORPHOLOGIE	30
2.	ANALYSE DES SPERMATOZOÏDES	31
3.	ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES	31
3.1.	HAPLOTYPES CYT B-----	31
3.2.	HAPLOTYPES COI-----	32
3.3.	MICROSATELLITES-----	34
4.	CARYOTYPAGE	35

CHAPITRE 5 - DISCUSSION ----- 36

1.	MORPHOLOGIE	36
2.	MORPHOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES	37
3.	ANALYSES GÉNÉTIQUES	38



3.1.	PHYLOGÉNIE MITOCHONDRIALE DE <i>CORBICULA</i>	38
3.2.	GÉNOTYPAGE DE <i>CORBICULA</i> : ANALYSES DE MARQUEURS MICROSATELLITES.	40
3.3.	HYBRIDATION	43
4.	PLOÏDIE	44
5.	ANDROGENÈSE	46
6.	SUPER CLONE ET “GENERAL PURPOSE GENOTYPE”	47

CHAPITRE 6 - CONCLUSION ET PERSPECTIVES ----- 48

1.	CONCLUSION	48
2.	PERSPECTIVES	49

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE



CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1. LES INVASIONS BIOLOGIQUES

1.1. LES ESPÈCES INVASIVES

Les espèces invasives sont des espèces qui ont été introduites, délibérément ou accidentellement, au-delà de leur zone de distribution naturelle ou de leur zone naturelle de dispersion potentielle. Les invasions biologiques peuvent résulter de changements climatiques ou tectoniques ainsi que d'introductions anthropiques (Vermeij 1996). Pour être un envahisseur efficace, une espèce non-indigène doit posséder certaines caractéristiques telles que, entre autres: une variabilité génétique et une plasticité phénotypique importantes, une tolérance physiologique aux changements abiotiques ainsi qu'une stratégie reproductive de type r (Sousa *et al.* 2008b).

Les invasions biologiques se déroulent suivant trois phases majeures : l'arrivée, l'établissement et l'intégration (Moyle & Light 1996). L'arrivée correspond à la dispersion des individus dans l'écosystème fraîchement envahi. L'établissement correspond au maintien de la population invasive, notamment par la reproduction. Enfin, le stade d'intégration est atteint lorsque l'espèce invasive et les relations qu'elle a établies avec les espèces natives influent sur la sélection (Vermeij 1996).

Les invasions biologiques ont d'énormes impacts environnementaux, sociaux, économiques et culturels. Les populations d'espèces non-indigènes augmentent à l'échelle mondiale et constituent des menaces majeures pour la biodiversité, l'environnement et les écosystèmes (Sandes 2003, Leung *et al.* 2002). D'un point de vue économique, les espèces non-indigènes représentent un coût, à l'échelle mondiale, estimé à 137 milliards de dollars US par an (Leung *et al.* 2002).

1.2. INVASIONS BIOLOGIQUES ET ECOSYSTÈMES DULÇAQUICOLES

La décennie 2005-2015 a été décrétée, par les Nations-Unies, Décennie Internationale d'Action « L'eau, source de vie ». En effet, la biodiversité et les ressources biologiques des eaux intérieures doivent faire face à des menaces de plus en plus importantes découlant des activités humaines. Ces mises en danger des écosystèmes dulçaquicoles sont notamment liées aux invasions de ces milieux par des espèces exotiques (Dudgeon *et al.* 2006). On peut citer de nombreux cas d'introduction qui ont complètement transformé un biotope dulçaquicole. Parmi les plus spectaculaires, on trouve l'introduction de la perche du Nil *Lates niloticus* dans le lac Victoria, ou encore l'invasion des rivières des plaines ouest-américaines par la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (Moyle et Light 1996).

En eaux douces, parmi toutes les espèces introduites, seuls 10 à 15% (U.S. Congress, OTA 1993) s'établissent et deviennent envahissants. Certaines conditions sont, en effet, requises pour rendre une invasion fructueuse. Parmi celles-ci, on peut citer : un nombre suffisant d'envahisseurs ; des caractéristiques biologiques des envahisseurs, tels que leur mode de reproduction, favorables à l'invasion ainsi que des conditions environnementales appropriées. Cependant, ces conditions ne se présentent généralement que sur de courtes périodes. Les conditions abiotiques peuvent déterminer à elles seules le devenir d'une invasion biologique (Moyle & Light 1996).



Malgré quelques exemples spectaculaires d'introductions destructrices des écosystèmes natifs (voir plus haut), la plupart des cas d'invasions n'est pas associée à des extinctions massives des populations natives. En effet, en plus de la compatibilité entre ses propres caractéristiques biologiques et le milieu envahi, cette espèce doit faire face à une résistance biotique à son établissement dans un nouvel écosystème. Cette dernière est principalement représentée par la prédation et la compétition avec les espèces natives. Parmi les invasions qui ont réussi, seule une minorité crée des changements majeurs dans les systèmes receveurs. Cependant, la majorité des envahisseurs cause des changements subtils, tels que des disparitions locales ou des changements comportementaux ou évolutifs des espèces natives (Moyle & Light 1996).

Bien que tous les systèmes aquatiques puissent potentiellement être envahis, tous ne réagissent pas pareillement aux invasions. Tout d'abord, les écosystèmes simples et à faible nombre d'espèces natives sont plus facilement déstabilisés que les écosystèmes complexes (Moyle & Light 1996). Ensuite, le niveau de perturbation de l'écosystème détermine également le succès d'une invasion. Les envahisseurs ont, en effet, plus de chance de s'établir quand les assemblages natifs d'organismes ont été temporairement perturbés ou amoindris (Moyle & Light 1996). De plus, la résistance biotique à l'invasion dans les systèmes d'eau douce se manifeste surtout dans les premiers stades du processus d'invasion. Le succès à long terme (intégration) d'une espèce invasive est plus probable dans un système aquatique altéré en permanence par l'activité humaine que dans un système légèrement perturbé.

La sensibilité à l'invasion d'un système aquatique naturel est liée aux interactions entre la variabilité et la prédictibilité environnementales. En général, les envahisseurs semblent moins s'établir dans des environnements hautement prédictibles quel que soit leur niveau de variabilité et semblent plus enclins à s'installer dans des environnements à faible prédictibilité (Moyle & Light 1996).

La phase critique lors d'une invasion est l'établissement. Durant cette période, c'est surtout l'accessibilité à la nourriture qui est limitante. Cette limitation fait des grands prédateurs piscivores et des organismes omnivores/détritivores les envahisseurs les plus efficaces. Les piscivores introduits se nourrissent d'animaux naïfs, incapables de reconnaître ces nouveaux prédateurs. Les omnivores/détritivores utilisent une source de nourriture rarement limitante dans les systèmes aquatiques. Ces groupes trophiques ont donc généralement un accès quasi-illimité à leurs ressources alimentaires.

1.3. LES BIVALVES DULÇAQUICOLES

Les Mollusques bivalves dulçaquicoles jouent un rôle important au sein des écosystèmes aquatiques (Strayer *et al.* 1999).

En effet, les bivalves constituent la majorité de la biomasse zoobenthique dans de nombreux fleuves, rivières, lacs et estuaires et sont les filtreurs principaux de nombreux écosystèmes en eau peu profonde. Les taux de filtration des populations de ces mollusques peuvent être considérables, atteignant de 10 à 100% de la colonne d'eau par jour. On peut donc facilement imaginer l'impact des bivalves sur la concentration et la composition en particules en suspension et donc sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes dulçaquicoles (Strayer *et al.* 1999).

Les activités humaines altèrent également souvent la densité et la composition des communautés de bivalves, et transforment de ce fait la structure et le fonctionnement des écosystèmes. On peut lier à l'homme de brutales augmentations ou diminutions des populations de bivalves. Les extinctions sont essentiellement dues aux récoltes des espèces économiquement intéressantes ainsi qu'à la pollution et autres altérations de leurs habitats.



De plus, on observe simultanément une destruction des populations par l'homme et des introductions massives, accidentelles ou délibérées, d'espèces invasives. Ces mollusques envahissants développent souvent des populations très denses avec de hauts taux de filtration (Strayer *et al.* 1999).

Bien qu'il soit avéré que les bivalves exotiques en eau douce aient un impact important sur le phytoplancton et les consommateurs qui en dépendent directement, le lien entre bivalves et écosystème est complexe et peut affecter l'écosystème de plusieurs façons. Les bivalves peuvent (1) enlever les particules en suspension (phytoplancton) de la colonne d'eau, (2) réduire les populations qui en dépendent, (3) augmenter les populations capables d'utiliser les bivalves ou leurs déchets, (4) libérer les ressources utilisées auparavant par le phytoplancton, et (5) augmenter les populations qui sont capables d'utiliser ces ressources libérées (Strayer *et al.* 1999).

Parmi les introductions de bivalves exotiques, la plus connue et spectaculaire reste sans doute celle de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* dans les Grands Lacs américains. *Dreissena polymorpha* est originaire du bassin Ponto-Caspien où elle vit principalement dans les lacs et les rivières à faible débit (Astaneï *et al.* 2005). Au XIX^e siècle, l'espèce s'est répandue vers l'ouest à travers toute l'Europe, aidée par des actions anthropogéniques, telles que la construction de canaux lors de la révolution industrielle (Khalaski 1997, Stepien *et al.* 2002, Astaneï *et al.* 2005). La moule zébrée fut introduite en 1986 dans la région des Grands Lacs, très certainement par l'intermédiaire des eaux de ballast. L'expansion initiale de l'espèce dans les Grands Lacs américains et les eaux intérieures américaines a été très rapide, faisant de *Dreissena polymorpha* l'invertébré benthique dominant dans ces écosystèmes (Mc Isaac 1996). En effet, on observe des densités pouvant aller jusqu'à 750000 individus/m² dans le lac Erie (McIsaac 1996).

L'introduction de *D. polymorpha* aux USA a causé des dommages écologiques et économiques non négligeables. L'espèce cause un encrassement des installations industrielles (prises d'eau et circuit de refroidissement des centrales électriques). On estime que les dommages industriels causés aux Etats-Unis par *D. polymorpha* coûteraient 5 milliards de dollars par an (Khalanski 1997). D'un point de vue écologique, *D. polymorpha* cause une clarification de l'eau, entre autre par une filtration massive de la biomasse algale et microzooplanctonique, cette filtration altérant également la chaîne trophique (McIsaac 1996, Stepien *et al.* 2002). On observe aussi une minéralisation des sédiments liée à la présence de la moule zébrée ainsi que la disparition des bivalves natifs, en particulier des *Unionidae*. En effet, *Dreissena polymorpha* utilise leurs ressources et occupe leur écosystème avec plus d'efficacité (Stepien *et al.* 2002).

En 1991, les premières traces d'une seconde espèce invasive de *Dreissenidae*, la moule quagga *Dreissena bugensis*, ont été mise en évidence dans les Grands Lacs américains. Cette dernière est aussi originaire du bassin Ponto-Caspien. Récemment, elle s'est fortement propagée dans cette région d'Amérique du Nord et est devenue tellement abondante qu'elle tend à supplanter *D. polymorpha* (Stepien *et al.* 2002). En Europe occidentale, l'introduction de *D. bugensis* est très récente et semble dater de 2004 (Molloy *et al.* 2007).



1.4. LE CAS DU GENRE *CORBICULA*

Avec les moules invasives du genre *Dreissena*, *Corbicula* est un des mollusques bivalves les plus invasifs jamais introduits aux USA (Aldridge & Müller, 2001) ainsi qu'en Europe où il a des impacts économiques et écologiques non-négligeables. Les genres *Dreissena* et *Corbicula* ont plus ou moins les mêmes conséquences sur les écosystèmes envahis et la même dynamique de dispersion en raison d'une majorité de caractéristiques biologiques très semblables (Tableau 1). Néanmoins, en Europe, *Dreissena* pourrait avoir un moindre impact en raison d'une invasion moins homogène et moins importante à certains endroits (Khalanski 1997).

La faune originelle des fleuves et rivières européens et nord-américains était dominée par les moules d'eau douce des familles des *Margaritiferidae* et des *Unionidae* et par de petites palourdes appartenant aux *Sphaeriidae*. Aujourd'hui cette faune native court un grand risque, en grande partie suite à la compétition qui s'engage entre ces familles et les espèces invasives telles que *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Limnoperna fortunei* (Sousa *et al.* 2008b). Aux Etats-Unis, la progression de *Corbicula* s'est accompagnée d'une régression de l'abondance des bivalves natifs. Dans l'estuaire du fleuve Minho au Portugal, *C. fluminea* est l'espèce dominante. Il apparaît que son essor s'est accompagné d'un appauvrissement de la faune en général et, plus particulièrement, de l'extinction progressive des espèces natives (Sousa *et al.* 2005). En Grande-Bretagne, *Corbicula* entre en compétition avec les *Unionidae* pour l'habitat et la nourriture (Aldridge & Müller, 2001). En ce qui concerne l'utilisation des ressources alimentaires, les corbicules sont des compétitrices très efficaces puisqu'elles ont des taux de filtration bien plus élevés que les espèces natives (Tableau 1, Sousa *et al.* 2008b). Leur potentiel reproducteur surpasse également largement celui des *Sphaeriidae* et des *Unionidae* (Tableau 1, Mouthon, 1981). De plus, les palourdes asiatiques peuvent atteindre des densités énormes. Dans la Seine, on trouve une centaine d'individus/m² (Vincent & Brancotte 2000); dans la rivière Altrhein, un peu en aval de la ville de Bâle (Suisse), les densités peuvent atteindre 600 individus/m² (Schmidlin & Baur); dans la Moselle, jusqu'à 9000 individus/m², et 10000 individus/m² dans le fleuve Paraná en Argentine (Cataldo & Boltoskoy 1999) ainsi qu'à divers sites aux Etats-Unis. Ces grandes densités augmentent l'impact sur les écosystèmes, à plus forte raison, au vu de la capacité de filtration des corbicules. Ces animaux peuvent filtrer d'énormes quantités de particules en suspension et de producteurs primaires dans la colonne d'eau (Aldridge & Müller, 2001, Sousa *et al.* 2008b). *Corbicula* est d'ailleurs reconnue comme la cause principale du déclin du phytoplancton dans la rivière Potomac, aux Etats-Unis (Cohen *et al.* 1984) ce qui n'est pas sans conséquence sur le reste de la chaîne alimentaire. En Meuse belge et française, l'introduction de *Corbicula* serait aussi la cause de la chute importante de la biomasse du phytoplancton amorcée en 2002 (Figure 1). C'est du moins l'hypothèse de notre unité de recherche (Jean-Pierre Descy, communication personnelle - testée pour l'instant dans un autre mémoire). En effet, aucun changement observé de la teneur en nutriment, du débit du fleuve ou des conditions météorologiques ne peuvent expliquer ces baisses surprenantes. La moule zébrée *Dreissena polymorpha*, également présente en Meuse, pourrait aussi avoir des effets importants sur le phytoplancton. Toutefois, depuis leur détection en 1994, les palourdes asiatiques se sont fortement propagées dans le fleuve et y ont atteint des densités plus importantes que celles des moules zébrées (CEME-Aquapôle Ulg & URBO-FUNDP 2007).

Outre leur influence sur le cycle des nutriments et du carbone organique dans la colonne d'eau, les palourdes affectent également la dynamique de la matière organique des sédiments. En effet, présentant une alimentation pédale, elles ont la capacité de collecter la matière organique des sédiments et contribuent ainsi à l'appauvrissement du contenu organique des sédiments (Aldridge & Müller 2001). De par leur double nutrition, les corbicules ont des



effets sur la faune de la colonne d'eau, ainsi que sur les organismes benthiques, en particulier dans les cours d'eaux où ces animaux invasifs sont présents à forte densité (Hakenkamp 2001).

L'invasion par les palourdes asiatiques n'est pas sans conséquence d'un point de vue économique. Son coût englobe les campagnes d'éradication et surtout les dommages causés par ces animaux aux installations industrielles. En effet, *Corbicula* peut bloquer les canaux de refroidissement des centrales électriques et thermiques, des réacteurs nucléaires ou les canaux d'irrigation. Les jeunes individus de faible taille pénètrent dans les circuits de prise d'eau des installations, y croissent et s'y développent jusqu'à éventuellement bloquer les systèmes de canalisation de par leur masse propre ou de par la masse de matériaux et de déchets biologiques qu'ils ont produits (Aldridge & Müller 2001). En France, *Corbicula fluminea* est un des principaux organismes établis dans les circuits des centrales thermiques exploitées par EDF. En 1990, la quantité de *Corbicula* retirée d'un bassin froid, de mai à fin septembre, a été estimée à environ 10m³ (Khalanski 1997).

Les caractéristiques naturelles du genre *Corbicula* sont les causes de son succès invasif (Sousa *et al.* 2008b). Tout d'abord, il présente une stratégie reproductive favorisant son expansion : maturité sexuelle précoce, croissance rapide, production d'un grand nombre de larves (Tableau 1). De plus, certaines espèces sont hermaphrodites et asexuées. Ces propriétés sexuelles permettent le développement d'une nouvelle population suite à l'introduction d'un seul individu (McMahon 1991).

La stratégie de colonisation de *Corbicula* repose en grande partie sur les stades juvéniles (McMahon & Williams 1986a). Ceux-ci sont capables de sécréter un filament muqueux qui leur permet de dériver en pleine eau et d'être entraînés par le courant. Grâce à ce pseudo-byssus, ils se fixent également aux coques et ancres des bateaux ou à des particules en suspension. Ce mode de dispersion passif permet une expansion en aval du cours d'eau. Néanmoins, *Corbicula* est capable d'étendre sa distribution vers l'amont (Voelz *et al.* 1998). En effet, il est possible que les corbicules puissent se fixer aux pattes des oiseaux ou aux poissons (Brancotte 2002, McMahon 1982). Bien que les palourdes asiatiques ne soient pas capables de survivre à un passage à travers le tractus digestif de leurs prédateurs, il semblerait qu'elles soient capables de survivre à une régurgitation du gésier de certains canards. Ceci pourrait également permettre un transport sur de faibles distances à travers les terres (Aldridge & Müller, 2001). De plus, il existe d'autres routes d'invasion de ce genre qui sont l'eau des ballasts et la consommation humaine. La rapide expansion de ce genre a aussi été favorisée par les activités humaines qui altèrent le biotope au départ favorable aux bivalves natifs, optimisant ainsi les conditions de dispersion de *Corbicula* (McMahon 1982). Voelz *et al.* (1998) ainsi que Beran (2006) suggèrent aussi que les corbicules pourraient se déplacer vers l'amont grâce à une certaine mobilité intrinsèque. En effet, lors d'une étude d'un affluent du fleuve Savannah en Caroline du Nord, aucune des données récoltées, ni le profil de distribution, ni le taux de dispersion n'allaient en faveur d'une colonisation en amont par les activités humaines ou animales (Voelz *et al.* 1998).

Il semblerait cependant que certains obstacles physiques freinent la propagation de *Corbicula*. Vincent et Brancotte (2000) montrent que le barrage de Jaulnes constitue une limite amont à l'expansion du genre dans la Seine. De même, les Montagnes Rocheuses et les Montagnes Appalaches semblent avoir freiné la propagation du genre aux Etats-Unis (McMahon 1982).



2. LE GENRE *CORBICULA*, GÉNÉRALITÉS

2.1. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

Originaires d'Asie centrale ainsi que des régions tropicales et subtropicales d'Asie (Thaïlande, Philippines, Chine, Taiwan, Corée et Japon), du Moyen-Orient, de l'Australie et d'Afrique, les *Corbicula* ont envahi les Amériques dès les années 1920 et l'Europe à partir des années 1980 (Figure 2). Cependant, des espèces du genre *Corbicula* sont présentes dans les fossiles nord-américains et européens datant d'avant la dernière glaciation. En Europe, *C. fluminalis* était présent aux ères tertiaire et quaternaire et particulièrement au Pléistocène. On en retrouve des traces dans des gisements fossilifères et des dépôts datant de cette époque en France, Angleterre, Belgique, Italie, Danemark et Allemagne (Meijer & Preece 2000). Dès lors, les invasions récentes de ces continents peuvent être vues comme un processus de recolonisation plutôt qu'une véritable invasion (Sousa *et al.* 2008b).

Aux Etats-Unis, le genre fut introduit accidentellement sur la côte Pacifique en 1924 en Colombie britannique. Il semble que cette introduction soit le fait des immigrants chinois pour qui *Corbicula* constituait une source de nourriture. En 40 ans, il s'est propagé jusqu'à la côte atlantique (McMahon 1982). Aujourd'hui, les palourdes ont envahi tout le continent américain : Amérique du Nord, Amérique Centrale et une partie de l'Amérique du Sud (Argentine, Brésil, Venezuela) (Brancotte 2002, Lee *et al.* 2005). Le genre est apparu pour la première fois en Amérique du Sud, dans les années 70, en Argentine et au Brésil (Ituarte 1994, Lee *et al.* 2005, Bagatini 2005). Son étendue actuelle va du nord de la Patagonie jusqu'à l'Uruguay et le sud du Brésil. Il est plus que probable qu'elle soit également présente au Pérou et en Bolivie (Karayatev *et al.* 2007). Néanmoins, la distribution américaine des corbicules est limitée au nord du continent américain par des températures trop basses durant l'hiver (McMahon 1982).

Il y a extrêmement peu de variabilité génétique et électrophorétique entre les populations des USA. Ceci suggère que la colonisation des eaux américaines par *Corbicula* résulterait d'un petit événement fondateur initial (Hillis & Patton 1982). Il convient de nuancer cette affirmation puisque certaines formes de corbicules sont asexuées (Glaubrecht *et al.* 2003, 2006). Ce mode de reproduction peut également expliquer l'uniformité génétique observée (Hedtke *et al.* 2008).

En Europe, le genre *Corbicula* semble avoir disparu après la dernière période glaciaire du Würm (Meijer & Preece 2000) pour réapparaître vers la fin des années 70 et le début des années 80 (Mouthon 1981).

Selon Bachmann (1997), les palourdes asiatiques auraient été introduites en Europe par l'intermédiaire des eaux de ballast des navires provenant du sud de l'Amérique du Nord et il n'y aurait de ce fait aucun lien géographique direct avec les populations de *Corbicula* asiatiques. En Europe occidentale, *Corbicula* a été détecté pour la première fois en France, en 1980, dans la basse Dordogne. Ce bivalve a été simultanément observé dans l'estuaire du Tage au Portugal (Mouthon 1981). La distribution actuelle du genre (Figure 3) comprend la France, le Portugal, l'Espagne (Araujo *et al.* 1993), l'Italie (Ciutti & Cappelletti 2009), les Pays-Bas (bij de Vaate & Greijdanus-klaas 1990), l'Allemagne (Kinzelbach 1991), la Belgique (Swinnen *et al.* 1998), le Luxembourg et la Grande Bretagne où l'introduction est récente (Aldridge & Müller 2001). Cette distribution semble s'étendre à l'Europe centrale et orientale: en Autriche (von Fisher & Schultz 1999), en Pologne (Skuza *et al.* 2009), en République tchèque (Beran 2006), en Slovaquie (Vrabec *et al.* 2003), en Hongrie (Csányi 1999) ainsi qu'en Bulgarie (Hubenov 2001), en Roumanie (Popa & Popa 2006), en Serbie



(Paunović *et al.* 2007) en Ukraine (Son 2007b) et en Moldavie (Munjiu & Shubernetski 2010). On trouve également *C. fluminea* en Suisse (Figure 3, Schmidlin & Baur 2007).

En France, la diffusion de *Corbicula* a été extrêmement rapide : en 20 ans, il a colonisé la totalité des grands bassins hydrographiques français (Marescaux *et al.* 2010) ainsi que différents fleuves côtiers. Le genre est présent dans la majorité des cours d'eaux, dans certains lacs, ainsi que dans de nombreux canaux de navigation. Ces canaux auraient joué un rôle essentiel dans la propagation de *Corbicula* à l'intérieur du pays (Brancotte & Vincent 2002, Mouthon 2000, Marescaux *et al.* 2010).

En Belgique, on trouve les premières traces de *Corbicula*, nommée à l'époque *C. fluminea*, dans la Meuse en 1994. Une autre espèce, *C. fluminalis*, était également signalée dans certains canaux, notamment en Flandres. Ces deux espèces peuvent également être trouvées en sympatrie (Tableau 2, Nguyen & De Pauw 2002). En une petite dizaine d'années, la distribution de *Corbicula* dans le pays s'est fortement élargie (Swinnen *et al.* 1998, Nguyen & De Pauw 2002) et le genre semble toujours en pleine expansion (Nguyen & De Pauw 2002). Swinnen *et al.* (1998) suggèrent que la colonisation a débuté par la Meuse et s'est étendue grâce aux canaux connecteurs et aux systèmes de canalisation des exploitations industrielles le long des cours d'eau.

2.2. SYSTÉMATIQUE

Les palourdes asiatiques du genre *Corbicula* sont reconnues comme appartenant à l'ordre des *Veneroida* et à la famille *Corbiculidae*. Toutefois, une grande controverse existe quant au nombre d'espèces de *Corbicula* présentes en Amérique et en Europe ainsi qu'à l'identification des espèces auxquelles elles appartiennent et desquelles elles découlent. Il y a en effet peu de caractères morphologiques permettant la discrimination des différentes espèces (Britton & Morton 1986). On peut tenter de distinguer ces différentes espèces par les caractères suivants : la couleur et la forme de la coquille ou le nombre de stries sur les valves (Figures 4 et 5, Brancotte & Vincent 2002). Cependant, on constate une énorme plasticité phénotypique (Britton & Morton 1986, Glaubrecht *et al.* 2003, Korniushev 2004, Sousa *et al.* 2008b, Swinnen *et al.* 1998) entre et au sein même des populations de palourdes asiatiques, comme c'est le cas pour la totalité des mollusques. On ne peut donc pas se fier uniquement à la morphologie pour délimiter une espèce. Outre la morphologie, la ploïdie, les préférences écologiques, l'haplotype mitochondrial, le génotype nucléaire ribosomal, le nombre de flagelles des spermatozoïdes ou encore le mode de reproduction peuvent servir de critères discriminants entre les différentes espèces. Toutefois, les auteurs ne s'accordent pas sur quelles espèces sont valides ou non et la classification varie selon le critère utilisé (Glaubrecht *et al.* 2007).

En Amérique et en Asie, une grande quantité de noms d'espèces avait été attribuée aux populations de *Corbicula* dans un premier temps (Park *et al.* 2004, Prasad 1924, Prime 1864; 1866). Par la suite, aux Etats-Unis, ces populations ne furent plus reconnues que comme appartenant à l'espèce *C. fluminea* (Britton & Morton 1979). Hillis et Patton (1982) ont ensuite décrit deux formes différentes qui se distinguent par leur morphologie. La première est caractérisée par une nacre violette et la seconde par une nacre blanche. Pour éviter la confusion par rapport au nom d'espèce, ces formes seront, dès lors, nommées « violette » et « blanche ». Outre la couleur de leur nacre, ces morphotypes se différencient également par le nombre de stries et la forme de la coquille. De plus, elles semblent avoir des préférences d'habitats différentes. Pour Britton et Morton (1986), ces formes sont des individus distincts d'un point de vue phénotypique mais appartenant à la même espèce qui n'est autre que *C. fluminea*. Ce polymorphisme serait dû à l'environnement. Lee *et al.* (2005) nomment, quant à



eux, ces deux morphotypes distincts forme A et forme B (Figure 4), correspondant respectivement à la forme blanche et à la forme violette. Ces morphotypes forment également des lignées distinctes au niveau du gène mitochondrial COI (Siripattawan *et al.* 2000, Lee *et al.* 2005, Hedtke *et al.* 2008). Une troisième forme, la forme C, est également décrite en Amérique de Sud (Lee *et al.* 2005). Les haplotypes des forme A et B sont également présents en Asie et en Europe, sans aucune ou extrêmement peu de différence (maximum une mutation) dans la séquence selon la distribution géographique (Lee *et al.* 2005, Park & Kim 2003, Pfenninger *et al.* 2002, Renard *et al.* 2000, Hedtke 2008). L'haplotype de la forme C est, quant à lui, distinct des haplotypes des formes de régions natives de *Corbicula* mais apparaît également dans les populations d'Europe occidentale (Renard *et al.* 2000, Hedtke *et al.* 2008). D'après Hedtke *et al.* (2008), la forme A et la forme B seraient dérivées, respectivement, de *C. leana* et *C. fluminea*, des espèces originaires d'Asie.

En Europe, uniquement les deux espèces *C. fluminea* et *C. fluminalis* avaient été décrites. Renard *et al.* (2000) confirment la présence de ces deux espèces distinctes morphologiquement et du point de vue de l'haplotype mitochondrial mais décrivent une troisième forme dans le Rhône. Cette population (*C. spec.*) n'est pas distinguable morphologiquement de *C. fluminea* mais possède un haplotype mitochondrial qui lui est propre. Il pourrait dès lors s'agir d'une espèce cryptique. Pfenninger *et al.* (2002) reconnaissent également, dans le Rhin, la présence de deux morphotypes différents avec quelques phénotypes intermédiaires. Ces formes morphologiques différentes sont nommées R (Round) et S (Saddle). Néanmoins, contrairement à Renard *et al.* (2000), ces auteurs ne mettent en évidence que deux clades d'haplotype distincts. Le premier correspond à celui de leur forme R, de la forme A des Etats-Unis et de *C. fluminea* telle que décrite par Renard *et al.* (2000). Le second clade comprend les individus du morphotype S mais correspond à l'haplotype de *C. spec.* de Renard *et al.* (2000). Cependant, morphologiquement, *C. spec.* n'est pas distinguable de *C. fluminea* et donc de la forme R. Une hypothèse postulée est donc que Renard *et al.* (2000) aient inversé les haplotypes de *C. fluminalis* qui correspondrait à la forme S et de *C. spec.* morphologiquement semblable à la forme R (Pigneur *et al.* subm.).

2.3. MORPHOLOGIE ET ANATOMIE

Le genre *Corbicula* comprend des espèces susceptibles de variations phénotypiques importantes, surtout au niveau de la forme, de la couleur et des sculptures de la coquille. Ce genre est donc caractérisé par un très grand polymorphisme. Il est communément accepté que les coquilles des bivalves dulçaquicoles présentent une grande plasticité pour s'adapter aux conditions environnementales et écologiques (Sousa *et al.* 2007). Ces variations écophénotypiques concernent également les palourdes asiatiques (Lee *et al.* 2005, Sousa *et al.* 2007, Sousa *et al.* 2008a). Toutefois, un rapport entre la largeur (L) et la hauteur (H) permet de caractériser les différentes formes de *Corbicula* européennes. Si $L > H$, on est en présence de la forme R. Dans le cas contraire, on a affaire à la forme S (Tableau 3, Brancotte & Vincent 2002, Pfenninger *et al.* 2002, Marescaux *et al.* 2010).

Les différentes formes possèdent des coquilles pouvant aller du vert olive au brun noirâtre ou être jaune ou crème. La forme S, qui est nettement plus haute que large, possède des stries fines et serrées. Par contre la forme R, relativement arrondie et dont la longueur est plus ou moins égale à la hauteur, présente des stries plus espacées (Figure 5). Les juvéniles de ce morphotype présentent de fines stries mauves sur leur umbo, la protrusion dorsale de la coquille (Britton & Morton 1986, Brancotte & Vincent 2002, Marescaux *et al.* 2010, observations personnelles). Généralement le morphotype R atteint de plus grandes tailles que la forme S (Swinnen *et al.* 1998). La couleur de la coquille interne de la forme R est blanchâtre et parfois parsemée de marques violettes. Celle de la forme S est mauve foncé



(Figure 5, Marescaux *et al.* 2010, Mouthon 1981, observations personnelles). La troisième forme (*C. spec.*) est, comme cité précédemment, morphologiquement similaire à la forme R. Néanmoins, sa coquille externe est plus claire. C'est de cette particularité morphologique qu'elle tire son nom forme Rlc (Marescaux *et al.* (2010), Pigneur *et al.* subm.). Quant à sa coquille interne, elle a une couleur entre le jaune et le blanc avec moins de reflets mauves. Ses juvéniles montrent un sommet rose-orangé (Marescaux *et al.* 2010, observations personnelles).

Dans le genre *Corbicula*, la ligne palléale et l'insertion des muscles sont très marquées sur l'intérieur de la coquille (Mouthon 1981).

Aux Etats-Unis, la forme blanche (forme A) a un périostracum de couleur jaune à brune et une nacre blanche présentant des marques roses ou violettes (Figure 4). La forme violette (forme B) va du vert sombre ou noir et possède une nacre uniformément violet foncé (Hillis & Patton 1982, Mouthon 2000). Si on compare morphologiquement les formes américaines et européennes qui sont identiques au niveau de leur haplotype mitochondrial, il apparaît que seules la forme A américaine et la forme R européenne se ressemblent. En effet, bien que semblables du point de vue génétique, les formes B et Rlc montrent des morphologies très différentes. Ce qui est aussi le cas pour les formes C et S (cf. 1.2.2., Lee *et al.* 2005, Pigneur *et al.* subm.).

Certaines populations peuvent montrer des aberrations morphologiques telles qu'une forte asymétrie ou des déformations des valves gauche ou droite (Vincent & Brancotte 2000, observations personnelles). De plus, il n'est pas rare de trouver des individus, surtout des adultes, dont le sommet est érodé (Mouthon 1981, observations personnelles).

2.4. BIOLOGIE

Selon Myazaki (1936), le genre *Corbicula*, dans sa distribution native, peut être divisé en trois groupes biologiques distincts (Tableau 4). Le premier comprend toutes les espèces monoïques, vivipares, incubant les larves au niveau de leurs hémibranchies et vivant en eau douce. *C. fluminea* et *C. leana* en sont les principales représentantes. Le second regroupe les espèces dioïques ne montrant pas d'incubation des larves et vivant également en eau douce telle que *C. sandai*. Quant au troisième groupe, il rassemble les espèces dioïques, n'incubant pas leurs larves et colonisant les eaux saumâtres dont *C. japonica*.

C. fluminea présente une croissance différentielle en fonction de la taille ainsi que de la saison. Les petits individus grandissent plus rapidement que les grands et les températures élevées de l'eau favorisent la croissance (Dubois & Tourenq 1995, McMahon & Williams 1986, Cataldo & Boltovskoy 1999, Morgan *et al.* 2003). La croissance varie donc selon le milieu considéré et la morphologie de l'animal, si bien qu'il est impossible de corrélér de façon générale la taille avec l'âge (McMahon & Williams 1986). Néanmoins, les palourdes ont une grande capacité de croissance qui peut être associée à leurs taux d'ingestion élevés. Ceux-ci permettent à ces mollusques des efficacités d'assimilation et de production nettes importantes, supportant ainsi une croissance rapide des tissus (McMahon 2002). Ces taux d'assimilation élevés permettent aux corbicules d'investir plus d'énergie dans leur reproduction que les autres bivalves dulçaquicoles. Le genre *Corbicula* présente une stratégie de reproduction de type r (Sousa *et al.* 2008b). En effet, il présente une forte fécondité et une mortalité à l'âge adulte élevée (McMahon 2002, Sousa *et al.* 2008) ainsi que diverses caractéristiques propres à cette stratégie.

Corbicula se nourrit majoritairement de phytoplancton comme le prouve la corrélation positive qui existe entre les contenus en chlorophylle et le nombre d'individus comptabilisés



en un endroit (Mouthon 2003). Toutefois, Mouthon (2003) a remarqué qu'on pouvait trouver des densités relativement importantes de palourdes sur des segments de cours d'eaux où la production de chlorophylle reste faible. Ceci est peut-être lié au fait que, contrairement aux autres mollusques d'eau douce non-natifs, le genre *Corbicula* est capable à la fois de se nourrir par filtration et par le pied par l'intermédiaire de cils. Cette propriété explique les capacités impressionnantes d'ingestion des corbicules. Ces animaux peuvent donc utiliser de manière significative les ressources en matière organique des sédiments (Hakenkamp & Palmer 1999).

La température influence non seulement la croissance mais aussi la reproduction des palourdes asiatiques. Lorsque les températures passent au-dessus de 15°-18°C, les corbicules passent d'une faible croissance et d'un état non-reproductif et inactif à une forte croissance et un état reproductif et actif (McMahon & Williams 1986). Cependant au-dessus d'un certain seuil de température (voir Chapitre 1, section 2.5), la production de descendance s'arrête et la croissance ralentit. A partir d'un certain stade, on assiste à une augmentation de la mortalité (Cataldo & Boltovskoy 1999). A la lumière de ces données, il apparaît que la saisonnalité influe sur la croissance annuelle de ces animaux (Morgan *et al.* 2003).

Les caractéristiques reproductives de *Corbicula* telles que sa grande capacité de reproduction et sa maturité sexuelle précoce (entre 3 et 9 mois (Tableau 1, Sousa *et al.* 2008b)), lui permettent de rétablir rapidement une population après un déclin massif (McMahon et Williams 1986).

Tous les auteurs s'accordent sur une même durée de vie pour *C. fluminea*, oscillant autour de 1,5-2 ans mais pouvant atteindre jusqu'à 3-4 ans (McMahon & Williams 1986, Morton 1986). Cependant, Schmidlin et Baur (2007) ont enregistré des individus âgés de 4 à 5 ans dans l'Altrhein près de Mainz. C'est également le cas dans la Saône où les animaux ont une durée de vie de 5 ans, qui peut être associée à une moindre croissance (Mouthon 2001), l'âge pouvant être estimé par le nombre de stries qui correspondent à des anneaux de croissance de la coquille (McMahon 1983).

2.5. ECOLOGIE

Au sein du genre *Corbicula*, on reconnaît deux types d'habitats majeurs : certaines formes vivent en milieu estuarien et donc dans des eaux saumâtres, alors que les autres, plus nombreuses, habitent dans des eaux douces (Miyazaki 1936, Glaubrecht *et al.* 2003).

Les espèces de ce genre sont assez peu exigeantes d'un point de vue écologique. *C. fluminea*, par exemple, est eurytherme, ubiquiste et peu sensible au pH. Toutefois, les hautes valeurs de potentiels rédox, les grandes concentrations en matière organique, la dureté de l'eau et les faibles concentrations en nitrate et en ammoniacque semblent favoriser la colonisation de cette espèce dans un habitat (Sousa *et al.* 2008a). Il ne semble également pas y avoir de corrélation entre la qualité des sédiments et l'abondance des palourdes asiatiques. Lors de leurs échantillonnages, Nguyen et De Pauw (2002) ont trouvé des animaux sur des sites de peu à fortement pollués par des contaminants organiques et des métaux lourds. Néanmoins, certains facteurs physico-chimiques (température, teneurs extrêmes en calcium, présence d'ammoniacque) sont limitants pour l'espèce (Bagatini *et al.* 2005). De plus, *Corbicula* ne vit que dans des eaux bien oxygénées (McMahon & Williams 1986a, Cataldo & Boltovskoy 1999) et ne résiste pas aux salinités élevées (Sousa *et al.* 2008b). A des salinités supérieures à 13 ppm, *C. fluminea* n'est plus capable d'osmoréguler et maintenir constantes ses concentrations internes en sels. Les corbicules deviennent osmoconformes et leur mortalité augmente progressivement avec la salinité et le temps (Morton & Tong 1985).



Comme cité précédemment, la température de l'eau est très critique en ce qui concerne la croissance des palourdes asiatiques (McMahon & Williams 1986). Dubois et Tourenq (1995) ont observé que dans le Canal Latéral de la Garonne, la croissance annuelle se déroule entre juin et septembre quand la température se situe entre 15°C et 27°C. Schmidlin et Baur (2007) ont enregistré le plus haut taux de croissance des populations du Rhin et de ses affluents à proximité de Bâle lorsque la température de l'eau est la plus élevée. De même, Britton & Morton (1986) n'enregistrent pas de croissance durant l'hiver chez les populations américaines qu'ils étudient. De plus, il semble que *C. fluminea* ait atteint la limite septentrionale de sa distribution en Amérique du Nord à cause de son intolérance pour les faibles températures hivernales de l'eau (McMahon 1982). Selon les auteurs, la température optimale de croissance varie mais elle se situe toujours autour de 20°C. Néanmoins, une trop grande température entraîne une létalité massive chez *Corbicula*. Selon les auteurs, ces températures létales sont supérieures à 30-37°C (McMahon & Williams 1986a, Morgan *et al.* 2003). En effet, au-dessus de 25°C, *Corbicula* n'est plus capable de maintenir des niveaux aussi efficaces de métabolisme aérobie et de filtration branchiale (McMahon 1983). D'après McMahon et Williams (1986a), les palourdes sont capables de survivre à une augmentation de la température (jusqu'à une température de 43-45°C) de courte durée (15-30 min) mais sont peu tolérantes à un tel accroissement à long terme.

Corbicula préfère les substrats à faible granulométrie, tels que le limon, le sable ou le gravier très fin, dans lesquels il peut s'enfouir. On observe rarement des substrats durs et rocheux colonisés par les palourdes adultes, seuls les juvéniles peuvent s'y attacher grâce au byssus muqueux qu'ils produisent (Bachmann 1997, Schmidlin & Baur 2007). Le genre *Corbicula*, étant en partie fouisseur, s'installerait de préférence dans un substrat meuble qui lui fournirait plus de nourriture qu'un substrat dur (Schmidlin & Baur 2007).

La vitesse du courant semble aussi affecter l'apparition de *C. fluminea*. Schmidlin et Baur (2007) n'ont trouvé d'individus vivants que dans les eaux calmes voire stagnantes. De plus, ils ont remarqué que les animaux étaient plus nombreux près des berges des rivières et que leur abondance diminuait avec un courant croissant vers le milieu du cours d'eau. La force du courant serait déterminante dans la colonisation des palourdes asiatiques puisqu'elle détermine l'accès à la nourriture, et plus particulièrement au phytoplancton.

Les habitats colonisés par *Corbicula* sont souvent caractérisés par une fluctuation du niveau de l'eau associée aux changements saisonniers en précipitations et aux potentielles sécheresses. Ces animaux peuvent donc être exposés à l'air. Néanmoins, contrairement aux espèces natives des familles des *Unionidae* et *Sphaeridae* qui sont capables de survivre plusieurs mois à une telle dessiccation, *Corbicula* est très intolérant aux périodes d'exposition à l'air, même de relativement courte durée (quelques jours) (McMahon 1983). Une raison de cette relative intolérance pourrait être le comportement unique du genre face à l'exposition à l'air. Pendant de courtes périodes, les valves sont entrouvertes et le manteau est directement exposé à l'air environnant. Ces courtes périodes alternent avec de longues périodes durant lesquelles les valves restent fermées, solidement scellées par du mucus durci. Pendant les périodes d'ouverture des valves, *Corbicula* maintient des taux de consommation d'oxygène élevés qui deviennent quasiment nuls lorsque les valves sont closes. Une hypothèse est que, lors de l'ouverture des valves, l'oxygène s'accumulerait au sein de la cavité palléale. Une fois les valves closes, l'oxygène stocké serait consommé jusqu'à la prochaine ouverture. Ce comportement offre aux palourdes asiatiques une protection contre la perte d'eau par évaporation. Néanmoins, il impose une économie en oxygène. Par ce système, *Corbicula* devrait donc avoir recours à la respiration anaérobie ce qui affecterait sa survie par une accumulation des déchets métaboliques jusqu'à des niveaux létaux. Par un entrebâillement permanent des valves, les autres bivalves ont, quant à eux, les tissus internes toujours en contact avec l'air. Par contre, les *Unionidae* et *Sphaeridae* présentent le système de loin le



plus perfectionné. En période d'exposition à l'air, ils prélèvent directement l'oxygène par diffusion à travers la coquille (McMahon 1983). En effet, leur coquille permet les échanges gazeux et donc l'élimination de certains déchets tout en limitant la perte d'eau.

En ce qui concerne ses prédateurs, le genre est une proie de choix pour certains oiseaux tels que le fuligule à tête noire *Aythya affinis* et le fuligule morillon *Aythya fuligula* (Aldridge & Müller 2001). De nombreuses espèces de poissons telles que *Cyprinus carpio*, ou des individus des genres *Ictiobus* et *Lepomis*, se nourrissent également de palourdes asiatiques (Robinson & Wellborn 1988). Les *Corbicula* subissent également la prédation du rat musqué *Ondatra zibethica*, comme le suggèrent les milliers de coquilles vides trouvées au pied des aires d'alimentations du rongeur (Vincent & Brancotte 2000).

2.6. CORBICULA COMME GENRE BIOINDICATEUR

Les espèces bioindicatrices, en milieu aquatique, servent de « détecteurs » des changements dans l'eau qui pourraient mettre en danger la vie aquatique (Doherty 1990). Parmi les espèces benthiques, les bivalves sont caractérisés par de très grandes capacités de bioaccumulation des métaux lourds (Baudrimont *et al.* 1997) ce qui en fait d'excellents senseurs biologiques.

Sousa *et al.* (2008b) ont proposé d'utiliser *C. fluminea* comme espèce bioindicatrice des habitats d'eau douce. En effet, elle montre des caractéristiques intéressantes pour son utilisation dans ce but. Tout d'abord, de par son caractère invasif, on la trouve en très grande abondance et ce partout dans le monde (Sousa *et al.* 2008b, Doherty 1990). Cette distribution mondiale et ubiquiste permet de pouvoir comparer les données de monitoring environnemental des écosystèmes d'eau douce à échelle mondiale. Ensuite, les populations de corbicules sont parmi les plus importantes dans les eaux douces. En outre, on trouve les palourdes asiatiques dans les environnements pollués et intacts. Enfin, les grandes capacités de filtration de *Corbicula* lui permettent de prélever une grande quantité de polluants dans l'environnement (Sousa *et al.* 2008b). *Corbicula* est donc un bioaccumulateur efficace de métaux lourds, de polluants organiques et d'autres éléments potentiellement toxiques présents à la fois dans les sédiments et dans la colonne d'eau (Doherty 1990, Cataldo *et al.* 2001). Tout indique donc que *Corbicula* soit un indicateur fiable d'une quelconque pollution mais également d'une contamination par des parasites d'origine fécale (Miller *et al.* 2005).

De nombreux exemples de l'utilisation de *Corbicula* pour évaluer les concentrations en polluants existent aussi bien en laboratoire que sur le terrain (Doherty 1990, Baudrimont *et al.* 1997). Des études dans lesquelles des palourdes asiatiques furent transportées de sites non-contaminés vers des sites contaminés ont également été menées (Doherty 1990).

Le monitoring environnemental grâce à *Corbicula* passe par l'observation de la croissance et de la survie des juvéniles (Cataldo *et al.* 2001), l'analyse de la composition chimique de la coquille ou encore le suivi de biomarqueurs spécifiques (Vidal *et al.* 2002) telles que certaines activités enzymatiques.



3. **CORBICULA, UNE REPRODUCTION ATYPIQUE**

Le genre *Corbicula* est très singulier en ce qui concerne sa reproduction. Tout d'abord, il présente des stratégies reproductives très différentes. Ensuite, ce genre est caractérisé par des propriétés de reproduction particulières: polyploïdie, sperme non-réduit et biflagellé, androgénèse et clonalité. Toutes ces particularités font du genre *Corbicula* un groupe modèle pour étudier les transformations des propriétés reproductrices d'un point de vue évolutif (Glaubrecht *et al.* 2003,2006).

3.1. **STRATÉGIES REPRODUCTIVES**

La première stratégie est rencontrée chez les populations hermaphrodites vivant en eau douce (Glaubrecht *et al.* 2003, 2006). Ces animaux incubent les larves au sein d'une poche marsupiale présente sur leurs hémibranchies internes (les bivalves possèdent deux paires de branchies) (Figure 6). Bien que les œufs possèdent un vitellus, l'épithélium de cette structure, par l'intermédiaire de cellules sécrétrices (Britton & Morton 1982), fournit les nutriments nécessaires au développement des stades larvaires. On peut donc parler à la fois de lécithotrophie et de matrotrophie. Ces animaux vivipares et hermaphrodites semblent se reproduire par un mode de reproduction très particulier sur lequel nous reviendrons plus tard: l'androgénèse. (Glaubrecht *et al.* 2006, Park & Chung 2004). Ces individus ont également la particularité de posséder des spermatozoïdes biflagellés.

Néanmoins, toutes les corbicules incubant leurs larves ne se reproduisent pas par androgénèse. Certaines formes d'Indonésie sont sexuées. Elles incubent les larves à très court terme et celles-ci sont relâchées au stade pédivéligné (Glaubrecht *et al.* 2003, 2006). Parmi ces *Corbicula*, certaines, comme *C. possoensis*, présentent une incubation tetragène, c'est-à-dire qu'elles utilisent à la fois leurs hémibranchies internes et externes (Glaubrecht *et al.* 2003).

La seconde stratégie de reproduction décrite dans le genre *Corbicula* concerne les animaux dioïques qui colonisent les eaux saumâtres, ainsi que *C. sandai*, une espèce lacustre endémique au lac Biwa (Japon) (Glaubrecht *et al.* 2003). Ces individus présentent une reproduction strictement sexuée. De plus, les palourdes de ce type relâchent des larves libres et nageuses qui n'ont pas été préalablement incubées (Byrne *et al.* 2000, Glaubrecht *et al.* 2003, 2006). Quant à leurs spermatozoïdes, ils sont monoflagellés. Cette stratégie reproductive, proche de celle des bivalves marins, pourrait constituer un caractère ancestral, comme le suggère Byrne *et al.* (2000).

3.2. **MORPHOLOGIE FONCTIONNELLE REPRODUCTIVE ET GAMETOGENÈSE CHEZ LES ESPÈCES HERMAPHRODITES**

Au sein du genre *Corbicula*, les hermaphrodites sont simultanés. Néanmoins, les structures reproductrices femelles se développent avant les structures mâles. Ensuite, celles-ci coexistent chez l'individu (Kraemer *et al.* 1986, Kraemer 1984).

Chez *C. fluminea* et *C. leana*, les gonades situées entre les diverticules digestifs et les couches fibromusculaires externes (Park & Chung 2004, Kraemer & Lott 1977) sont formées de follicules soit oogéniques, soit spermatogéniques ou encore hermaphrodites (Park & Chung 2004, Kraemer *et al.* 1986), ces derniers produisant des oocytes et des spermatozoïdes.



Le tissu reproducteur mâle est en large minorité par rapport au tissu femelle. Il ne constitue, en effet, que 15% de la masse folliculaire (Kraemer & Lott 1977). Des cellules muqueuses sont associées au tissu reproducteur (Park & Chung 2004). Ces cellules sécrétrices apportent des nutriments aux embryons et semblent jouer un rôle dans le passage des juvéniles hors des branchies (Byrne *et al.* 2000).

Les gamètes mâles et femelles, bien que produits dans des parties différentes du tissu reproducteur, sont éjectés par les mêmes conduits, les gonoductes (Kraemer & Lott 1977).

Parallèlement au développement des gonades, on assiste à une expansion du tissu nerveux lié au tissu reproducteur (Kraemer 1984, Kraemer *et al.* 1986). Dans un premier temps, il y a une innervation importante des lèvres des gonoductes qui sont les premières structures à apparaître. Une fois que les follicules sont bien étendus, des agrégats de corps neuronaux apparaissent et constitueront les ganglions folliculaires. Ceux-ci permettraient la coordination de la production de gamètes, la maturation du sperme, la fécondation interne croisée et l'autofécondation (Kraemer 1984, Kraemer *et al.* 1986). Soulignons néanmoins que la fécondation croisée est privilégiée (Kraemer & Galloway 1986).

Les follicules oogéniques et hermaphrodites sont le siège de l'oogenèse qui est continue, dès la maturité sexuelle, et tout au long de la vie (Park & Chung 2004, Byrne *et al.* 2000). La spermatogenèse, quant à elle, a lieu dans les follicules spermatogéniques et hermaphrodites. Contrairement à l'oogenèse, la production de gamètes mâles est saisonnière, ces saisons étant le début du printemps et le début de l'été (Kraemer & Galloway 1986). Elle diminue avec une atrophie des follicules spermatogéniques à intervalle régulier et semble être liée à la température de l'eau (Park & Chung 2004, Kraemer *et al.* 1986, Kraemer & Galloway 1986).

3.3. CYCLE DE VIE DES ESPÈCES VIVIPARES

La fécondation a lieu dans la cavité palléale (Sousa *et al.* 2008b). Cette fécondation peut, dès lors, être considérée comme interne. Ensuite, les larves sont incubées dans le marsupium des hémibranchies internes (Park & Chung 2004). Un très grand nombre de larves peut être incubé dans les hémibranchies des corbicules (Figure 6). Chez *C. madagascariensis* et *C. australis*, ce nombre oscille entre 500 et 3000 embryons (Glaubrecht *et al.* 2006, Byrne *et al.* 2000). Ces larves présentent aussi un développement très rapide (Figure 7, Kraemer & Galloway 1986).

Chez les formes hermaphrodites, à l'exception de *C. australis* chez qui elle est continue pendant 8 mois (Byrne *et al.* 2000), la reproduction est biannuelle (Kraemer & Galloway 1986, McMahon & Williams 1986a, McMahon & Williams 1986, Britton & Morton 1986). En effet, on observe chez *Corbicula fluminea* deux périodes d'incubation de larves au niveau des hémibranchies internes des adultes : l'une au printemps-début de l'été, l'autre à la fin de l'été-automne (Mouthon 2001, Aldridge & McMahon 1978). L'occurrence des fraies peut parfois diverger de ce schéma (Doherty *et al.* 1987, McMahon & Williams 1986a, Dubois & Tourenq 1995, Morgan *et al.* 2003, Mouthon 2001, Vidal *et al.* 2002). Morgan *et al.* (2003) n'ont observé qu'un pic de reproduction dans les populations de palourdes asiatiques du fleuve Connecticut, aux Etats-Unis. Dubois & Tourenq (1995), quant à eux, ont mis en évidence trois pics de recrutement des juvéniles chez les populations de *C. fluminea* dans la zone profonde du Canal Latéral de la Garonne près de Toulouse. Le nombre de périodes de reproduction sur l'année varie d'un écosystème à l'autre. Ces fluctuations peuvent être liées aux températures de l'eau ainsi qu'à l'accessibilité des ressources de nourriture (Sousa *et al.* 2008b). Le nombre de recrutement peut également diminuer si le cours d'eau montre des périodes de crues sévères ou si la période hivernale est plus longue (Morgan *et al.* 2003).



Lors de la fraie, les larves migrent à travers les branchies vers la poche du siphon exhalant où les contractions de la musculature palléale permettent leur éjection. Le relâchement des larves est sous le contrôle de la température de l'eau ainsi que la teneur en oxygène dissous. Ces facteurs sont, en effet, déterminants dans le « timing » du développement. Le début de la fraie coïncide avec la période à laquelle la température de l'eau passe au dessus de 20°C (Kraemer & Galloway 1986). Expérimentalement, on peut induire la libération des larves en augmentant la température de l'eau de 20° à 26°C (Komaru *et al.* 2000). La taille des pontes semble corrélée à la taille de la coquille de l'adulte (Byrne *et al.* 2000).

Chez *C. fluminea*, l'incubation se prolonge jusqu'à un stade avancé du développement de la progéniture et les larves sont relâchées au stade juvénile. Elles sont encore très petites, entre 200µm et 250µm (Britton & Morton 1986) mais sont complètement formées et possèdent une coquille (Glaubrecht *et al.* 2006). Seul le stade juvénile est adapté à la dispersion. En effet, les stades précédents souffrent de la pression osmotique ou ont une motilité limitée (Byrne *et al.* 2000). Une fois largués dans la colonne d'eau, les juvéniles s'ancrent aux sédiments, à la végétation ou à des surfaces dures, grâce à leur pseudo-byssus. Ces juvéniles peuvent aussi être re-suspendus pour des courants turbulents et dispersés sur de longues distances en aval (Sousa *et al.* 2008b).

3.4. REPRODUCTION UNISEXUÉE

L'unisexualité est caractérisée par une hérédité nucléaire soit strictement maternelle, soit strictement paternelle, ainsi que par très peu de recombinaison génétique (Grebelnyi 2009). Un tel mode de reproduction apparaît chez divers groupes animaux mais est relativement rare au sein des vertébrés. Parmi ces derniers, on ne trouve des espèces unisexuées que chez les poissons et les amphibiens (Tableau 5, Grebelnyi 2009, Lombardi 1998). L'unisexualité semble être rendue possible par une ou plusieurs aberrations des mécanismes gamétogénétiques pré-méiotiques et méiotiques, comme le révèle la ploïdie des gamètes chez les espèces unisexuées (Lombardi 1998, Komaru *et al.* 1997). La majorité des taxons unisexués sont exclusivement composés de femelles et sont supposés être parthénogénétiques. Cependant, d'autres types de reproduction et d'hérédité unisexuée ont été décrits. Ces modes de reproduction sont la gynogenèse, l'hybridogenèse et l'androgenèse (Grebelnyi 2009).

Lors de la parthénogenèse, il n'y a pas de fécondation et l'œuf se développe sans participation d'un spermatozoïde. Le génome maternel est donc transmis à la descendance sans aucun changement. La descendance d'une population gynogénétique est issue d'œufs non fertilisés mais dont le développement a néanmoins été stimulé par des spermatozoïdes. Ceux-ci pénètrent dans l'œuf mais le pronucleus mâle est très vite éliminé (Grebelnyi 2009). La différence entre la gynogenèse et l'hybridogenèse réside dans le fait que dans le second cas, les jeunes proviennent d'œufs fécondés. Cette descendance est uniquement constituée de femelles et lors de l'oogenèse, les chromosomes provenant du père sont éliminés. Les œufs matures ne contiennent donc que le matériel génétique maternel. Par conséquent, ces œufs ne pourront produire la génération suivante que s'ils sont fécondés par les spermatozoïdes d'un mâle d'une espèce proche. L'androgenèse, quant à elle, pourrait être considérée comme l'opposé de la gynogenèse. En effet, un spermatozoïde pénètre l'œuf mais très vite, le pronucleus femelle est expulsé (Grebelnyi 2009, Komaru 1998). Chez *Corbicula*, qui est un des très rares genres animaux à présenter ce type de reproduction, la progéniture ne garde que les chromosomes du spermatozoïde non réduit.



3.5. ANDROGENÈSE

C'est en observant de la polyploïdie chez *Corbicula*, que des scientifiques ont émis l'hypothèse d'une reproduction unisexuée chez cet animal (Komaru *et al.* 1997, Komaru & Konishi 1999). Dans un premier temps, ils ont penché en faveur d'une reproduction par gynogenèse. En effet, *C. leana* est triploïde (Komaru *et al.* 1997). Ce nombre inhabituel de chromosomes peut être expliqué par le fait que chez les individus gynogénétiques, les œufs sont généralement non réduits. De plus, la gynogenèse est un phénomène légèrement plus fréquent que l'androgenèse dans le monde animal (Tableau 6, Komaru *et al.* 1997).

Néanmoins, Komaru *et al.* (1997) mettent en évidence que les spermatozoïdes de cette espèce ainsi que ceux de *C. fluminea* (Komaru & Konishi 1999) ont une même quantité d'ADN que les cellules somatiques. L'observation de l'expulsion des chromosomes maternels sous forme de globules polaires ainsi que l'absence de formation d'un pronucleus femelle vient étayer la thèse d'une reproduction par androgenèse (Figure 8, Komaru *et al.* 1998, 2000). L'expulsion du matériel génétique maternel commence dès l'anaphase de la première division de méiose. La seconde division ne se produit pas et le zygote résulte de la mitose du pronucleus mâle, lui-même issu d'un spermatozoïde non réduit (Komaru *et al.* 2000). La descendance sera donc génétiquement identique au spermatozoïde dont elle est issue. Dans le genre *Corbicula*, chez les espèces androgénétiques, on a observé ce mode de reproduction chez des individus diploïdes, triploïdes et tétraploïdes (Komaru & Konishi 1999, Qiu *et al.* 2001).

Bien que l'androgenèse puisse être induite expérimentalement chez certaines espèces, de très rares cas naturels ont été décrits dans le règne animal (McKone & Halpern 2003). On a observé de l'androgenèse chez la petite fourmi de feu, *Wasmannia auropunctata*, chez qui les mâles produisent d'autres mâles par clonage (Queller 2005, Fournier *et al.* 2005). Il en est de même chez les hybrides entre les phasmes *Bacillus rossius* et *Bacillus grandii* (Mantovani & Scali 1992). Dans le règne végétal, le cyprès du Sahara, *Cupressus dupreziana* présente également ce mode de reproduction (Pichot *et al.* 2001). L'androgenèse se produit également, à faible fréquence, lors de croisements contrôlé chez le colza *Brassica napus* (Chen and Heneen 1989).

L'expansion des gènes de l'androgenèse aboutit toujours à une fixation qui mène majoritairement à l'extinction de la population. Cependant, chez les individus hermaphrodites, comme *Corbicula*, l'autofécondation limite ce risque d'extinction (McKone & Halpern 2003).

La présence d'un œuf lors de l'androgenèse est nécessaire pour fournir les ressources indispensables au développement de la progéniture. Les ressources femelles sont donc des facteurs limitant la capacité de reproduction androgénétique au sein d'une population (McKone & Halpern 2003). Néanmoins, chez *Corbicula*, le sperme androgénétique a la capacité de parasiter les oocytes d'autres espèces, ou de formes proches, pour profiter des nutriments maternels tout en étant capables d'en expulser le génome nucléaire. Ce phénomène de parasitisme a été mis en évidence dans des populations où l'on observe une disjonction génétique entre le matériel nucléaire et mitochondrial (Figure 9, Park *et al.* 2002, Pfenninger *et al.* 2002, Lee *et al.* 2005, Hedtko *et al.* 2008, Pigneur *et al.* subm.). Hedtko & Hillis (2011) ont nommé cette disjonction mismatch cytonucléaire. Entre espèces proches, cette capacité confère à celles qui sont androgénétiques un avantage par rapport à celles qui sont sexuées. Ceci pourrait également expliquer pourquoi, malgré le risque d'extinction qu'elle amène, l'androgenèse est maintenue chez certains animaux, comme *Corbicula*, où plusieurs espèces au sein du même genre semble se reproduire par androgenèse (Hedtko *et al.* 2008, McKone & Halpern 2003).

Pourquoi l'androgenèse n'a-t-elle été décrite que dans 3 taxons animaux? Une raison est que ce mode de reproduction est effectivement très rare ce qui est lié au risque d'extinction après



fixation des allèles propre à l'androgénèse. Une autre raison est qu'elle est difficile à détecter. En effet, il faut absolument passer par des analyses génétiques et cytologiques pour la mettre en évidence. De plus, les mutations nécessaires à l'apparition d'un génotype androgénétique pourraient être moins fréquentes que celles causant la gynogénèse. Néanmoins, ces deux modes de reproduction sont quasiment également répandus et diversifiés (Tableau 6). Par ailleurs, la plupart des biologistes n'ont pas envisagé l'androgénèse comme étant un mode de reproduction possible (McKone & Halpern 2003).

D'un point de vue cytologique, chez la palourde asiatique, les chromosomes maternels sont expulsés sous forme de deux corps polaires (Figure 8, Komaru *et al.* 1998, Komaru *et al.* 2000). Ceci pourrait résulter d'une modification au niveau des sites d'attachement des centrosomes lors de la méiose ainsi que de l'orientation particulière de l'axe méiotique. Chez *Corbicula leana*, une espèce androgénétique, l'axe méiotique est parallèle à la surface cellulaire alors qu'il y est perpendiculaire chez la plupart des bivalves ainsi que chez les corbicules sexuées (Komaru *et al.* 2000, Obata *et al.* 2006). Par ailleurs, chez les corbicules androgénétiques, les deux centrosomes semblent attachés au cortex cellulaire, ce qui explique l'orientation du fuseau (Komaru *et al.* 2006). A l'opposé, chez les palourdes asiatiques sexuées, un seul centrosome est attaché au cortex, le second restant au centre de l'œuf (Obata *et al.* 2006). Ishibashi *et al.* (2002) ont également montré l'implication du cytosquelette dans les mécanismes d'androgénèse chez *Corbicula*. Ces auteurs ont traité des œufs de *C. leana* avec de la cytochalasine D, une substance inhibant la polymérisation d'actine et donc la formation des corps polaires. Les centrosomes méiotiques ainsi que les chromosomes maternels sont retenus dans le cytoplasme de ces œufs et les pronuclei femelles se constituent. La méiose continue alors jusqu'à la seconde division. Le maintien des centrosomes maternels au sein du cytoplasme de l'œuf semble nécessaire à la poursuite de la méiose. En effet, chez *Corbicula* comme chez de nombreuses autres espèces animales, les centrosomes paternels sont inactifs lors de cette division (Ishibashi *et al.* 2002). Le résultat obtenu par Ishibashi *et al.* (2002) suggèrent que chez *C. leana*, le système régulant la seconde méiose est encore fonctionnel. A contrario, Ishibashi & Komaru (2006) en réalisant la même expérience chez *C. fluminea* observent une deuxième division méiotique abortive. Cette ségrégation aberrante pourrait découler de mutations des facteurs régulant la méiose dont certains ne sont pas essentiels chez les individus androgénétiques.

3.6. ANDROGÉNÈSE ET SYSTÉMATIQUE

L'androgénèse ajoute une difficulté supplémentaire à l'établissement d'une taxonomie claire au sein du genre *Corbicula*. En effet, ce mode de reproduction peut mener à l'observation de disjonction génétique noyau/mitochondrie. Lee *et al.* (2005) ont, en effet, mis en évidence des individus ayant le morphotype et le génotype nucléaire de la forme A mais le génotype mitochondrial de la forme B. Hedtke *et al.* (2008) ont observé un événement similaire ainsi que son contraire (des individus de forme B avec des haplotypes mitochondriaux de la forme A). Les auteurs expliquent cette observation par le phénomène de parasitisme des œufs précédemment décrit (Figure 9). Dans ce cas, il y aurait eu une capture du génome mitochondrial après qu'un spermatozoïde de la forme A ait parasité un œuf d'une palourde de la forme B. L'androgénèse et ses conséquences au point de vue génétique démontrent que les analyses du génome mitochondrial ne sont pas suffisantes pour étudier génétiquement les espèces androgénétiques telles que *Corbicula*. Par ailleurs, comme précisé auparavant, la morphologie ne suffit également pas et il est préférable de combiner les marqueurs génétiques nucléaires et mitochondriaux aux quelques caractères morphologiques bien distincts pour décrire des espèces androgénétiques.



3.7. SPERMATOZOÏDE BIFLAGELLE NON REDUIT

Comme cité précédemment, on trouve au sein du genre *Corbicula* deux formes différentes de spermatozoïdes. Les premiers sont monoflagellés alors que les seconds sont biflagellés. La morphologie des gamètes mâles semble être corrélée au mode de reproduction (Komaru & Konishi 1996). Les individus dioïques à reproduction sexuée montrent des spermatozoïdes monoflagellés. Ceux-ci ont, comme attendu, une ploïdie réduite. Ce type de spermatozoïde est considéré comme primitif au sein du genre. Les corbicules hermaphrodites et se reproduisant par androgenèse présentent, quant à elles, des spermatozoïdes biflagellés et non-réduits.

Des spermatozoïdes biflagellés ont été décrits chez quelques familles de poissons téléostéens (Mattei 1988, Matos *et al.* 2002), chez certains amphibiens (Aguilar *et al.* 2003) et insectes (Dallai *et al.* 2001). Les plathelminthes parasites montrent également des spermatozoïdes possédant deux axonèmes (Justine *et al.* 1985, Pamplona-Basilio *et al.* 2001). Néanmoins, un spermatozoïde peut développer deux flagelles lors de la spermatogenèse ou résulter de la fusion de deux spermatozoïdes différents, comme c'est le cas chez certains insectes aptérygotes (Dallai *et al.* 2001). Suite à ce « pairing », le spermatozoïde présentera alors 2 acrosomes et 2 noyaux.

Dans le genre *Corbicula*, hormis leurs deux flagelles, chacun possédant son propre centriole, les spermatozoïdes biflagellés possèdent d'autres modifications par rapport aux spermatozoïdes « normaux ». Leur tête et leur noyau sont plus allongés et ces gamètes ne possèdent pas de pièce médiane distincte. De plus, le long des flagelles, on voit une structure ailée qui pourrait augmenter l'efficacité de flagellation et/ou la pénétration de la gelée autour des oocytes (Komaru & Konishi 1996). D'après les mêmes auteurs, ces spermatozoïdes modifiés représenteraient un caractère évolué des palourdes hermaphrodites.

Les deux flagelles des spermatozoïdes de *Corbicula* sont de même longueur et capables tous les deux de battre. Leur motilité est activée par l'AMP cyclique (AMPc) et le GMP cyclique (GMPc) (Howard *et al.* 2004). Ces nucléotides sont, en effet, des seconds messagers importants dans la régulation de la flagellation chez les animaux. Bien que ces flagelles soient tous les deux capables de mouvement, leurs profils (inflexion et longueur d'onde) de battement sont différents.



4. POLYPLOÏDIE

4.1. POLYPLOÏDISATION : GÉNÉRALITÉS

La polyploïdisation qui correspond à l'addition d'un ou plusieurs sets complets de chromosomes et donc à une augmentation de la taille du génome, est une des mutations les plus extrêmes qui peut toucher un patrimoine génétique. Néanmoins, les plantes à fleurs et les vertébrés seraient issus d'ancêtres polyploïdes (Otto 2007), la polyploïdisation constituant un des moteurs principaux de l'évolution des angiospermes. Une ou deux duplications complètes du génome seraient à l'origine des vertébrés (Hypothèse 2R). De plus, la lignée des poissons téléostéens aurait subi une duplication complète du génome supplémentaire après leur divergence d'avec les mammifères (Jaillon *et al.* 2004).

La polyploïdie peut causer de graves anomalies développementales chez les mammifères et les oiseaux. Pourtant, elle est très bien tolérée par un grand nombre d'eucaryotes. Moins répandue dans le règne animal et souvent associée à une reproduction asexuée, on en relève quelques 200 cas, majoritairement chez les invertébrés, mais aussi chez les amphibiens et les poissons (Gong *et al.* 2004, Otto 2007).

Même si elle est bien présente chez de nombreuses espèces animales, la polyploïdisation réduit souvent la fertilité et/ou la survie. Cependant, certaines espèces polyploïdes sont capables de produire une descendance viable, comme c'est le cas pour l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* 3n (Gong *et al.* 2004, Guo & Allen 1994) ou encore *Corbicula* 3n (Okamoto & Arimoto 1986, Park *et al.* 2000, Skuza *et al.* 2009, Qiu *et al.* 2001) et 4n (Qiu *et al.* 2001).

La polyploïdie peut aussi amener des avantages non-négligeables. Tout d'abord, les duplicatas de gènes introduits par polyploïdisation sont soumis à une moindre pression de sélection que les gènes présents en une seule copie. Dès lors, ils peuvent développer, à long terme, de nouvelles fonctions (néofonctionnalisation). Des variations génomiques impossibles dans les lignées diploïdes peuvent apparaître chez les individus polyploïdes. Ces modifications des caractères génétiques des polyploïdes peuvent être bénéfiques et, par exemple, leur permettre une meilleure adaptation à un environnement particulier (Otto 2007). Ensuite, la polyploïdie permet de masquer les mutations délétères d'un set haploïde. Cet avantage n'est pas absolu puisqu'au cours du temps, les allèles mutants s'accumulent bien plus chez les individus polyploïdes que chez les diploïdes. Enfin, de manière générale, la taille des cellules augmente avec celle du génome. Ceci est particulièrement vrai pour les mollusques bivalves. Induire artificiellement une polyploïdisation chez ces animaux représente donc un intérêt commercial (Gerard *et al.* 1994, Gong *et al.* 2004, Otto 2007).

4.2. POLYPLOÏDISATION AU SEIN DU GENRE *CORBICULA*

Chez *Corbicula*, des individus diploïdes, triploïdes et tétraploïdes ont été décrits (Tableau 7, Hedtke *et al.* 2008, Komaru *et al.* 1997, Okamoto & Arimoto 1986, Park *et al.* 2000, Skuza *et al.* 2009, Qiu *et al.* 2001). Okamoto & Arimoto (1986) ont mis en évidence le nombre de chromosomes suivant pour 3 espèces japonaises. *C. japonica* possède 38 chromosomes, *C. sandaii* 36 et *C. leana* 54. Ces nombres correspondent à un set haploïde de 18 chromosomes. En effet, *C. leana* présente 3 jeux de 18 homologues. D'après ces auteurs ainsi que Skuza *et al.* (2009), *C. sandaii* pourrait être l'espèce ancestrale ayant donné naissance à *C. japonica*, elle-même ayant engendré *C. leana*. Un des facteurs de l'évolution, chez *Corbicula*, aurait donc été la polyploïdisation.



En Europe, on a relevé uniquement des individus diploïdes et triploïdes. Pfenninger *et al.* (2002) ont obtenu un caryotype de 36 chromosomes quels que soient le morphotype, le génotype et l'haplotype mitochondrial analysés alors que Skuza *et al.* (2009) ont observé un caryotype de 54 chromosomes chez des populations polonaises de *C. fluminalis*. Ces caryotypes peuvent être divisés en 18 groupes de 2 ou 3 chromosomes semblables phénotypiquement. Ceci suggère que 18 semble être le nombre haploïde chez *Corbicula*.

L'hybridation *in situ* sur les « Nucleolar Organizing Regions » (NOR) permet également de mettre en évidence de la triploïdie (Skuza *et al.* 2009, Hedtke *et al.* 2008). En effet, la forme A d'Amérique (Hedtke *et al.* 2008) ainsi que *C. fluminalis* (Skuza *et al.* 2009) en Pologne présentent 3 NOR. Sachant qu'on trouve un organisateur nucléolaire par set haploïde, ces palourdes sont donc triploïdes.

Chez *Corbicula*, la ploïdie semble être liée au mode de reproduction. Les palourdes asiatiques polyploïdes, ou tout au moins triploïdes, sont hermaphrodites et semblent se reproduire par androgenèse (Okamoto & Arimoto 1986, Komaru *et al.* 1997, Hedtke *et al.* 2008). La perturbation de la méiose menant à la formation de gamètes non-réduits et l'autofécondation possible liée à cette stratégie reproductive joueraient un rôle dans la polyploïdie de certaines espèces de *Corbicula* (Okamoto & Arimoto 1986). Skuza *et al.* (2009) suggèrent également un lien entre polyploïdie et adaptation à de nouveaux habitats chez la palourde asiatique, en se basant sur le fait que les individus polyploïdes ont une plus grande faculté d'expansion que leurs ancêtres diploïdes. Ces auteurs proposent également le nombre et la morphologie des chromosomes comme critère supplémentaire de détermination des espèces de ce genre.

Chez les palourdes androgénétiques où le génome maternel est expulsé, les spermatozoïdes non réduits représentent un moyen de maintenir le niveau de ploïdie. Cependant, les mécanismes d'élévation de la ploïdie restaient inconnus dans les espèces androgénétiques de *Corbicula*. Récemment, Komaru *et al.* (2006) ont observé une seconde division de méiose et la formation d'un pronucléus femelle chez certains individus de *C. fluminea*, une espèce androgénétique. Ils postulent qu'une fois que l'androgenèse s'est établie chez les formes diploïdes, une élévation subséquente de la ploïdie ne peut se faire que par la rétention des globules polaires. Cette affirmation est confirmée par Komaru *et al.* 2001, 2006. Ces auteurs ont, en effet, observé une extrusion incomplète du matériel génétique maternel après fécondation d'un ovule par un spermatozoïde d'une autre forme. Lors de la première méiose, si un seul centrosome est attaché au cortex cellulaire, seul un premier corps polaire sera formé. Le second globule polaire et un pronucléus femelle peuvent alors se former après la deuxième division. Dans ce cas, après fécondation, un zygote triploïde émergerait puisque le spermatozoïde dont il provient est diploïde. La non-formation d'un seul des globules polaires peut donc résulter en l'augmentation de la ploïdie. Chez *Corbicula*, l'élévation de la ploïdie serait due à la formation d'un pronucléus femelle, événement rare, plutôt qu'à des événements d'hybridation comme c'est le cas chez les vertébrés (Komaru *et al.* 2006).

L'impact de la polyploïdie chez les palourdes androgénétiques reste toujours inconnu. Néanmoins, chez ces individus, la polyploïdisation permettrait de maintenir les allèles fonctionnels lorsque des allèles non-fonctionnels s'accumulent (Ishibashi & Komaru 2006).



CHAPITRE 2 - OBJECTIFS DU MÉMOIRE

Etant donné les difficultés taxonomiques rencontrées dans l'étude de *Corbicula*, une première partie de ce mémoire tend à clarifier la systématique du genre en Europe. Ce travail a donc pour but de dénombrer les formes européennes ainsi que d'établir les relations phylogénétiques entre-elles et avec d'autres formes ou espèces présentes ailleurs dans le monde. En menant cette **étude phylogéographique**, nous voulons déterminer les routes d'invasion des lignées des palourdes du genre *Corbicula* invasives. Ceci est d'autant plus pertinent que *Corbicula* est un des organismes les plus envahissants dans les écosystèmes dulçaquicoles. En effet, depuis le début du XX^e siècle, certaines espèces de palourdes asiatiques se sont propagées depuis leur distribution native sur tout le continent américain et en Europe. Ces études phylogénétiques de diverses populations européennes se baseront sur l'analyse des gènes mitochondriaux suivant : le gène de la cytochrome oxydase sous-unité I (COI) et du cytochrome b (Cyt b) mais également sur des marqueurs microsatellites nucléaires. Ces populations auront été, auparavant, caractérisées morphologiquement.

Les palourdes asiatiques sont également très singulières du point de vue de leur reproduction : certaines espèces se reproduisent par androgenèse. Afin de **déterminer le mode reproductif** des populations de corbicules européennes, nous en analyserons le sperme. En effet, il existe un lien entre morphologie des spermatozoïdes et mode de reproduction, les spermatozoïdes biflagellés n'étant rencontrés que chez les individus androgénétiques.

La polyploïdisation semble également avoir joué un grand rôle dans l'évolution du genre *Corbicula*. En Asie, des populations diploïdes, triploïdes et tétraploïdes ont été décrites. Néanmoins, on sait peu de chose sur la ploïdie des formes européennes (Pfenninger *et al.* 2002, Skuza *et al.* 2009). Ce mémoire s'attèlera donc aussi à **déterminer la ploïdie** d'individus de la Meuse par la réalisation d'un caryotype. De plus, déterminer la ploïdie de populations européennes nous renseignera également sur le mode de reproduction de ces individus. En effet, il semble y avoir un lien entre polyploïdie et androgenèse.



CHAPITRE 3 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. SPÉCIMENS ÉTUDIÉS

Dans le tableau 8 et l'annexe 1 sont présentées les différentes populations européennes de *Corbicula* étudiées dans ce mémoire, ainsi que le morphotype supposé de ces populations, le nombre d'individus étudiés dans chaque analyse étant repris dans le tableau 9. Marescaux *et al.* (2010) ont échantillonné les individus de la Seine en avril 2009 en sondant le fond du fleuve au moyen d'une épuisette. Les autres individus nous ont été fournis par J. Mouthon (Doubs et Saône, France), P. Laforge (Vidourle), N. Spann (fleuve New Bedford, UK), R. Sousa (estuaires du fleuve Minho et du fleuve Lima, Portugal), C. Ayres (bassin de Minho, Espagne) et N. Perrin (Lac de Neuchâtel, Suisse) (Annexe 1). Les individus échantillonnés ont été conservés dans de l'éthanol.

En ce qui concerne l'analyse des marqueurs microsatellites, aux populations précédentes, nous avons ajouté 9 populations dont l'haplotype mitochondrial avait déjà été étudié par Marescaux 2010 (Annexe 2).

2. ANALYSES MORPHOLOGIQUES

Nous avons mesuré les trois variables morphométriques suivantes : la hauteur, la plus grande dimension dorsoventrale; la largeur, la dimension antéropostérieure maximale et l'épaisseur de la coquille, la plus grande épaisseur de la paire de valves (Figure 10, Britton & Morton 1982). Les mesures ont été réalisées au moyen d'un pied à coulisse (SOMEX-0,1mm). Nous avons également compté le nombre de stries pour chaque individu. Vingt individus pour chaque population ont été mesurés ou tous les individus si moins de 20 avaient été échantillonnés. De plus, des observations générales (forme, couleur, niveau d'érosion...) des coquilles externe et interne ont été notées.

A partir de ces données morphométriques, nous avons réalisé des analyses en composantes principales (ACP) grâce au progiciel ade4 (Université Lyon 1) sur le logiciel de statistique R-2.11.0. La première analyse a été effectuée sur les ratios suivants : nombre de stries/hauteur, hauteur/épaisseur, largeur/épaisseur et hauteur/largeur. La seconde analyse fut réalisée sur les logarithmes en base 10 de la largeur, de la hauteur et de l'épaisseur de la coquille ainsi que sur le ratio nombre de stries/hauteur.

L'ACP est un outil statistique qui permet l'analyse de jeux de données multivariés. Elle utilise les mathématiques pour transformer un nombre de variables corrélées en variables non-corrélées, les composantes principales, et en limiter le bruit.



3. ISOLATION DES SPERMATOZOÏDES

Ce protocole a été modifié d'après Britton & Morton 1982, Guo & Allen 1994, Howard *et al.* 2004 et Marescaux 2010 (mémoire).

Les individus conservés dans l'éthanol ont été ouverts en faisant attention à ne pas déchirer l'hépatopancréas. La masse viscérale a été dégagée du manteau et des branchies (Figure 11), et tranchée quasiment tangentielle. De cette manière, nous avons pu récupérer les gonades qui sont diffuses à la surface de la masse viscérale. Le tissu excisé a été placé dans un tube eppendorf 1,5ml, dans lequel on a ajouté de la collagénase diluée dans du Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, Sigma Aldrich) jusqu'à une concentration de 1mg/ml. Une fois les gonades humidifiées, elles ont été cisaillées. Ensuite, nous avons ajouté la solution collagénase-RPMI au tissu pour atteindre un volume final de 600µl. Le tissu excisé a été incubé à 45°C jusqu'à dégradation complète. Après dégradation, les échantillons ont été centrifugés pendant 3 minutes à 3000rpm. Une goutte de culot a été pipetée, déposée sur une lame de verre et couverte d'une lamelle. Les lames ont été observées au moyen d'un microscope à contraste de phase (Leica Leitz LaborluxS), à grossissement 100 fois et sous immersion. Pour chaque population, 4 individus ont été analysés, à l'exception de la population de la Seine, où 2 individus ont été analysés faute d'un échantillon suffisant, et de la population de la Saône (forme R) pour laquelle on a étudié 8 individus (Tableau 8).

4. ANALYSES GÉNÉTIQUES

4.3. DISSECTION

Pour chacun des 20 individus par population, les muscles adducteurs et le pied (Figure 11) ont été prélevés et stockés dans des tubes eppendorfs à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

4.4. EXTRACTION D'ADN

L'ADN a été extrait des muscles adducteurs, à l'exception de l'échantillon Db2 (pied), au moyen du kit d'extraction DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) selon le protocole de ce kit (Annexe 3), à l'exception d'une digestion à la RNase A après lyse complète des tissus. Seuls six individus par population ont été extraits (Tableau 8). Les 6 individus appartenant aux populations Vidourle, Saône forme R et Saône forme S ont été extraits en automatisant l'utilisation du kit sur la machine QIAcube (QIAGEN).

4.5. AMPLIFICATION DES GÈNES CIBLES MITOCHONDRIAUX (TABLEAU 9)

L'ADN extrait a servi de support à une réaction en chaîne par polymérase (PCR). Deux gènes cibles mitochondriaux ont été amplifiés par PCR : le gène Cytochrome oxydase I (COI) et le gène Cytochrome b (Cyt b). Des contrôles positif et négatif ont été introduits lors de chaque amplification. Le contrôle positif est un échantillon ayant déjà été amplifié avec succès et à la taille de fragment requise. Le contrôle négatif était une réaction sans ADN.

Après une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C, la PCR se poursuivait par 30 cycles composés des 3 étapes suivantes : dénaturation de 45 secondes à 94°C, 45 secondes



d'hybridation (42° pour le gène Cyt b et 45° pour le gène COI) et 45 secondes d'extension à 72°C. Le programme se terminait par une extension finale de 10 minutes à 72°C. La PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µl incluant respectivement 0,5 ou 1 µl d'ADN pour Cyt b ou COI. Le mix PCR était composé d'eau stérile, de tampon Taq 1× (Promega), de 0,2mM de nucléotides (Promega), de 0,5µM de chacune des différentes amorces (IDT Integrated DNA Technology) et de 0,1 unité de Taq DNA Polymerase (Promega). Les produits PCR ont été colorés au SYBR safe (Invitrogen) et isolés sur des gels d'agarose 1% révélés sous lumière UV.

4.6. ANALYSES DES SÉQUENCES

Pour la plupart des produits d'amplification, seul un brin a été séquencé. Cependant, pour chaque gène cible, cinq échantillons provenant de populations différentes (Es1, Db1, Db21, Uk1 et S1) ont été séquencés dans les deux sens. Le séquençage a été réalisé auprès de la firme Macrogen Korea sous les conditions de BigDye™ terminator. Les produits PCR, préalablement purifiés, y ont été passés au séquenceur automatique 3730XL (Applied Biosystem).

Les séquences obtenues ont été corrigées et alignées manuellement grâce à BioEdit (version 7.09). Ces séquences ont été regroupées en haplotypes. Les séquences de mauvaise qualité ont été éliminées avant de construire les phylogénies. Afin de déterminer les modèles évolutifs de substitution nucléotidique pour construire les phylogénies, nous avons utilisé le programme jModelTest0.1 (Posada 2008). Les phylogénies COI et Cyt b furent inférées en utilisant les méthodes de Neighbor Joining, de Maximum likelihood et d'inférence bayésienne. Les phylogénies par Neighbor Joining ont été construites en utilisant Mega 4 (Tamura *et al.* 2007), celles par Maximum likelihood en utilisant PhyML 3.0. (Guindon & Gascuel 2003) et l'inférence bayésienne en utilisant MrBayes v.3.2.1. (Huelsenbeck & Ronquist 2001). La fiabilité des arbres est estimée par une approche de bootstrap avec 1000 répliques. En ce qui concerne l'inférence bayésienne, la fiabilité est basée sur les probabilités postérieures.

Neocorbicula limosa (Corbiculidae) a été utilisé comme outgroup pour la phylogénie basée sur le gène COI. Etant donné qu'aucune séquence du gène cytochrome b de *Corbiculidae* n'est accessible sur GenBank, on a utilisé le bivalve *Arctica islandica* (Arcticidae) comme outgroup pour la phylogénie basée sur le gène Cyt b.

Afin de déterminer les variations nucléotidiques entre nos séquences, nous avons utilisé le logiciel DnaSP (Rozas & Rozas 1995).

Le programme Network 4.5.1.6. (Flux engineering) nous a finalement permis de construire des réseaux d'haplotypes par la méthode de Median Joining (Bandelt *et al.* 1995).

4.7. AMPLIFICATION DES MOTIFS MICROSATELLITES (TABLEAU 10)

Rappelons que, pour ces analyses microsatellites, de nouvelles populations ont été ajoutées. Ces populations sont celles analysées d'un point de vue mitochondrial par Marescaux (2010) (Tableau 8, Annexe 2).

L'ADN extrait a servi de support à une réaction en chaîne par polymérase (PCR). Dix motifs microsatellites cibles ont été amplifiés par PCR.

Après une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C, la PCR se poursuivait par 35 cycles composés des 3 étapes suivantes : dénaturation de 45 secondes à 94°C, 45 secondes



d'hybridation à 53°C et 45 secondes d'extension à 72°C. Le programme se terminait par une extension finale de 12 minutes à 72°C. La PCR a été réalisée dans un volume total de 10µl incluant 1 µl d'ADN. Le mix PCR était composé d'eau stérile, de tampon Taq 1× (Promega), de 0,2mM de nucléotides (Promega), de 0,5µM de chacune des différentes amorces (IDT Integrated DNA Technology) et de 0,1 unités de Taq DNA Polymerase (Promega), l'amorce forward étant fluorescente (6-FAM) et pourvue d'une PGI-tail GTTTCTT. Les produits PCR ont ensuite été dilués 200 fois. Si la quantité d'ADN obtenue après PCR était faible, la dilution était adaptée et revue à la baisse. À 1µl de produits PCR dilués on a ajouté 10µl de formamide Hi-Di (Applied Biosystems) et 0,1µl de marqueur de taille GeneScan-500 (LIZ) (Applied Biosystems). Chacun de ces échantillons a ensuite été génotypé sur le séquenceur à capillaires ABI 3130xl (Applied Biosystems) et les résultats ont été analysés par le programme GeneMapper (Applied Biosystems).

Quatre autres loci (CI5, CIB08, CIG08 et CIF04) ont été utilisés pour une analyse plus approfondie des individus à morphotype intermédiaire de la Seine et de l'individu Uk3, de potentiels hybrides entre les formes R et S. Ces marqueurs permettent de discriminer les deux formes précédentes par une simple visualisation sur gel. Les conditions de PCR étaient identiques à celles citées ci-dessus. Néanmoins, aucune des deux amorces utilisées dans ce cas n'était ni fluorescente ni pourvue d'une PIG-tail.

Ensuite, nous avons procédé à une analyse statistique, l'analyse factorielle des correspondances (AFC) grâce au progiciel ade4 (Université Lyon 1) sur le logiciel de statistique R-2.11.0. L'AFC permet d'analyser des tableaux de contingences. Un tel tableau croise 2 variables qualitatives. A l'intersection de deux variables qualitatives se trouve l'effectif caractérisé par l'une et l'autre variable. L'AFC détermine les dépendances entre les lignes et les colonnes du tableau. Une représentation graphique (un plan factoriel) permet de visualiser les relations les plus importantes. Dans le cas qui nous préoccupe, les variables qualitatives étaient d'une part, les différents allèles microsatellites rencontrés lors de cette étude et d'autre part, les formes de corbicules étudiées. Notre tableau de contingence était, en fait, une matrice de présence-absence (0-1), chaque ligne correspondant à une forme de *Corbicula*, et chaque colonne à un allèle observé (Annexe 14).

5. ANALYSE DE LA PLOÏDIE

5.1. CARYOTYPES

Le protocole utilisé dans ce mémoire a été développé d'après les protocoles de caryotype sur bivalves de Cornet *et al.* 1993 (*M. edulis*), Guo & Allen 1994 (*C. gigas*), Komaru *et al.* 1997 (*Corbicula*), Le Marrec-Croq *et al.* 1999 (*P. maximus*), Quinn *et al.* 1999 (*D. polymorpha*), Park *et al.* 2000 (*Corbicula*), Boroń *et al.* 2004 (*D. polymorpha*), Lee *et al.* 2005 (*Corbicula*) et Skuza *et al.* 2009 (*Corbicula*). Les précieux conseils de Mme S. Rombout de l'IPG (Institut de pathologie et de génétique) à Gosselies où nous avons passé une journée d'apprentissage des techniques de caryotypage, nous ont également permis d'améliorer notre protocole.

Les caryotypages ont été réalisés sur des individus vivants du morphotype R récoltés aux écluses de Tailfer (50° 24' N 04° 54' E) et de Dinant (50° 15' N 04° 54' Est) sur la Meuse belge.

Dans un premier temps, nous avons tenté de réaliser nos caryotypes à partir de tissu directement prélevé sur des corbicules vivantes. On injectait aux corbicules 100µl de chlorure de cobalt (CoCl₂) 0,5%. Ce dernier, en bloquant certaines étapes de la respiration cellulaire,



provoque une hypoxie des tissus et, de ce fait, induit une prolifération cellulaire. L'incubation au CoCl_2 durait entre 50 et 60 heures. Au terme de celle-ci, on injectait encore aux individus 0,25ml de colchicine 0,1% qu'on laissait incuber toute une nuit. Durant tout ce temps, les animaux étaient gardés vivants dans de l'eau de Meuse aérée et nourris avec les algues *Dictyosphaerium ehrenbergianum* et *Chlorella vulgaris*. Les branchies étaient ensuite disséquées et soumises à un traitement permettant la réalisation d'un caryotype (quasiment similaire à celui décrit ci-après). Cependant, l'index mitotique étant très faible chez *Corbicula* (Skuza *et al.* 2009) et cette technique ne donnant pas de bons résultats, nous avons préféré ajouter une étape de culture cellulaire.

Après récolte des individus, ceux-ci ont été disséqués et les branchies prélevées. Le tissu a été lavé 3 fois pendant 20 min avec du milieu de culture 4 fois plus concentré en antibiotiques que le milieu utilisé pour la culture proprement dite (Annexe 4). Le tissu a ensuite été rincé et placé dans une boîte de Pétri dans quelques gouttes de milieu normal. Les branchies ont été cisailées au scalpel. Le contenu de la boîte de Pétri a été récupéré par aspiration au travers d'une aiguille fine (23 – 25G) pour éviter les morceaux trop gros. Les fins fragments tissulaires ont été déposés dans des tubes Falcon de 15ml dans 3 ml de milieu. Les tubes ont été conservés légèrement inclinés pendant au moins 6 jours à 18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) à l'obscurité. Le pH et les éventuelles contaminations étaient contrôlés quotidiennement grâce au phénol red, l'indicateur de pH présent dans le milieu, ce dernier ayant été changé maximum tous les 4 jours. Après 6 ou 7 jours de culture, de la colchicine était ajoutée à une concentration finale de 0,1% au milieu pour bloquer la division cellulaire et la culture était maintenue pendant encore 12 heures.

Les cellules étaient alors prêtes pour le caryotypage. Les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 1200rpm et le surnageant aspiré. Les cellules ont subi dans un premier temps un traitement hypotonique consistant à les laisser dans 7 ml de KCl 0,075M préalablement préchauffé à 37°C pendant 30 minutes. Le KCl a été ajouté goutte à goutte sur vortex. Ensuite, les différents tissus ont été centrifugés à 1200 rpm pendant 10 minutes et le surnageant a été aspiré. Les cellules ont ensuite été fixées au moyen de 5 ml de fixatif de Carnoy (mix frais méthanol ou éthanol absolu:acide acétique glacial 3:1) qui a été ajouté goutte à goutte. Elles ont incubé pendant 15 minutes sous hotte à température ambiante dans le fixatif puis ont été centrifugées à 1200rpm pendant 10 minutes. Cette opération a été répétée deux fois mais sans étape d'incubation. Ensuite, les cellules ont été remises en suspension dans du fixatif.

Trois gouttes de ces suspensions ont été déposées depuis une hauteur de 10-15cm sur des lames préalablement nettoyées à l'alcool et placées sur du papier humide, cette dernière étape permettant une meilleure diffusion de la suspension cellulaire sur la lame. Les lames ont séché à l'air libre, idéalement pendant 1 jour et 1 nuit. Les lames ont ensuite été plongées dans un bain de GIEMSA 2% pendant 15 minutes avant d'être rincées à l'eau distillée pour enlever l'excès de colorant. Les lames ont enfin été séchées au papier buvard et observées au microscope (Leica Leitz LaborluxS) à grossissement 100 fois.



CHAPITRE 4 - RÉSULTATS

1. MORPHOLOGIE

Selon la description de Marescaux *et al.* (2010), toutes les populations étudiées ici semblent constituées d'individus appartenant à une des trois formes européennes décrites jusqu'à présent (formes R, S ou Rlc) (Tableau 3, Figure 5), à l'exception des individus provenant de la Seine. Ces derniers présentent un morphotype intermédiaire entre les formes R et S. La forme arrondie de leur coquille est typique du morphotype R. Leur umbo arbore des marques violettes comme chez les juvéniles R. Cependant, ces individus présentent aussi des attributs de la forme S, tels que des stries fines et serrées, ainsi qu'une coquille interne violet foncé (Figure 12).

Quel que soit le paramètre considéré par l'analyse en composantes principales considérée, 88% des individus sont regroupés dans le même cluster (Figure 13, points bleus et verts). Cette observation n'est pas surprenante puisque la majorité des populations étudiées sont considérées comme appartenant aux formes R ou Rlc (Tableau 8), qui sont difficilement distinguables morphologiquement. Néanmoins, lorsqu'on considère l'analyse prenant en compte les ratios entre les différentes variables, les individus du morphotype Rlc se regroupent en marge du cluster comprenant les individus du morphotype R (Figure 13 A). Cette distinction se marque sur l'axe 2 qui est fortement corrélé aux variables « Hauteur/Largeur » et « Hauteur/Épaisseur » (Annexe 5). En effet, les individus du morphotype Rlc présentent des ratios « Hauteur/Largeur » et « Hauteur/Épaisseur » significativement plus faible que ceux des individus du morphotype R (Annexe 6, $p\text{-value} < 0.05$).

Quelle que soit l'ACP considérée, la population de la Saône appartenant au morphotype S forme un groupe distinct d'un point de vue morphologique (Figure 13, points noirs). Dans la première ACP, prenant en compte les ratios entre les différentes mesures, cette différence de la population Saône S se marque sur l'axe 1 (Figure 13A). Cet axe est principalement corrélé aux ratios « nombre de stries/hauteur » et « largeur/épaisseur » (Annexe 5). Dans la seconde analyse, dont les variables sont le « nombre de stries/hauteur » et les logarithmes des hauteur, longueur et largeur, la différence est marquée sur le second axe en composante principale (Figure 13B), lui aussi principalement corrélé au ratio « nombre de stries/hauteur » (Annexe 7).

Dans la seconde ACP, il est également évident que les trois individus de la Seine forment un groupe distinct sur l'axe 2 (Figure 13B, points rouges), essentiellement corrélé au ratio « nombre de stries/hauteur ». Cette dernière variable est celle ayant le plus de poids dans les deux analyses (Annexe 5 et 7).

Ces ACP confirment ce qui a été observé auparavant : les trois individus de la Seine et ceux du morphotype S ont un nombre et une répartition des stries significativement différents des autres populations contenant les formes R et Rlc (Annexe 8, $p\text{-value} < 0.05$). Ces individus présentent, en effet, un rapport « nombre de stries/hauteur » plus élevé.

Certains individus (Po7, Es4 and Uk12) provenant de différentes populations sont, selon la première ACP (Figure 13A), distincts de ce qui semble être une morphologie générale pour le morphotype R auquel ils appartiennent. L'individu Es4 présente un plus petit ratio hauteur/épaisseur. Po7 a des plus grands ratios hauteur/épaisseur et largeur/épaisseur, tandis que Uk12 en a de plus petits. Po7 semble donc être plus aplati que la moyenne, alors qu'Uk12 est plus épais.



Lorsqu'on envisage l'ACP 2, l'individu Es19 se distingue sur le second axe en composante principale, celui-ci étant principalement corrélé au ratio nombre de stries/hauteur (Figure 13B, Annexe 7). En effet, pour cet individu, ce rapport est très faible. Cet individu a un nombre de stries beaucoup plus faible que la moyenne de ceux des autres individus de taille comparable du morphotype R auquel il appartient (10 stries contre une moyenne de 19,83 pour une hauteur moyenne de 12,3mm, alors que l'individu Es19 mesure 13,2mm de haut).

2. ANALYSE DES SPERMATOZOÏDES

Dans cette analyse, quatre individus par population ont été étudiés, en général. Toutefois, nous n'avons analysé la morphologie des spermatozoïdes de deux spécimens uniquement pour la population de la Seine, faute d'un échantillon assez grand. Pour la population de la Saône forme R, huit individus ont été analysés, afin d'augmenter la probabilité d'observer des spermatozoïdes dans cette population (Tableau 8).

Nous avons trouvé des spermatozoïdes au sein de toutes les populations étudiées sauf chez les individus d'Espagne et du morphotype R de la Saône pour lesquels nous n'en avons observé aucun (Tableau 11).

Grossièrement, au microscope optique, les spermatozoïdes flagellés de *Corbicula* présentent seulement une tête allongée effilée et le plus souvent légèrement incurvée ainsi qu'un (ou deux) flagelle(s). Il n'y a pas de pièce médiane distincte entre la tête et le flagelle. Tous les spermatozoïdes examinés correspondent à cette description. Aucun dimorphisme n'a été observé.

Nous avons observé des spermatozoïdes sans flagelle, monoflagellés et biflagellés (Figure 14) chez toutes les populations positives. Nous avons également trouvé quelques gamètes mâles possédant un très court flagelle (entre 5 et 10% de la longueur maximale du flagelle). Les populations pour lesquelles seuls des juvéniles ont été récoltés (Seine, Suisse) présentent aussi des spermatozoïdes.

L'abondance relative exacte de chaque type de morphologie de sperme n'a pas été chiffrée. Cependant, les spermatozoïdes sans flagelle étaient bien plus nombreux que les monoflagellés, eux-mêmes surpassant, en nombre, les biflagellés.

Nos observations n'ont pas révélé de différence de morphologie ou d'abondance entre les spermatozoïdes des différentes formes européennes.

3. ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES

3.1. HAPLOTYPES CYT B

Les séquences de Cyt b sont longues de 351 bp, polymorphique à 13 sites et groupées en 3 haplotypes différents (Annexe 9). L'haplotype 1 (H1) correspond au morphotype R, alors que l'haplotype 2 est lié au morphotype Rlc. Néanmoins, deux individus du Doubs (Db1 et Db3) décrits comme appartenant, d'un point de vue morphologique, à la forme R présentent des haplotypes mitochondriaux de la forme Rlc (H2). La détermination du morphotype des individus Db1 et Db3 a été basée sur observations. En effet, l'analyse en composantes principales ne permet pas de distinguer avec certitude les morphotypes R et Rlc (Figure 13). L'haplotype 3 (H3), quant à lui, est partagé par les individus du morphotype S et les individus du morphotype intermédiaire de la Seine.



L'haplotype 1 est le plus courant parmi les populations étudiées ; il correspond à 74% de toutes les séquences, soit 45 séquences sur 61 (Annexe 17). Néanmoins, l'individu Su2 de la forme R présente une séquence légèrement différente de celle de l'haplotype 1. Les deux séquences diffèrent à seulement 3 sites aux extrémités des séquences où la détermination des bases correctes est malaisée. Dès lors, nous avons retiré cet individu Su2 de cette analyse.

Quelle que soit la méthode phylogénétique utilisée, nous avons obtenu des topologies d'arbre similaires (Figure 15). Etant donné l'absence de séquences de Cyt b de *Corbicula* accessibles sur GenBank, nous n'avons pas pu comparer nos séquences à d'autres pour le gène Cyt b. Néanmoins, par alignement manuel, nous avons trouvé nos séquences du gène Cyt b exactement identiques à celles de Marescaux 2010 (mémoire). Notre séquence de l'haplotype 1 (H1) est identique aux séquences de la forme R de Marescaux 2010 (mémoire). La forme Rlc de ce dernier montre la même séquence du gène Cyt b que notre haplotype 2 (H2), alors que ses séquences de la forme S sont identiques à notre haplotype 3 (H3).

La phylogénie Cyt b nous permet de distinguer 3 lignées génétiques distinctes, celles-ci correspondant aux trois morphotypes distincts (Figure 15). Nous n'avons pas pu trouver de séquence de Cyt b de *Corbiculidae* sur les bases de données. Dès lors, nous avons choisi comme outgroup *Arctica islandica* qui fait partie de l'ordre *Veneroida*, auquel appartient également le genre *Corbicula*.

La phylogénie (Figure 15) montre que les formes R et Rlc sont plus proches entre elles que de la forme S. Ceci est confirmé par le réseau d'haplotypes (Figure 16). Ce réseau nous indique également le nombre de mutations séparant les séquences de deux formes européennes. Les formes R et Rlc diffèrent par 5 mutations, les formes R et S par 9 mutations et les formes Rlc et S par 10 mutations (Figure 16).

3.2. HAPLOTYPES COI

Les séquences du gène COI obtenues chez un total de 62 individus ont une longueur d'approximativement 668 pb et sont groupées en seulement 3 haplotypes distincts. Ces haplotypes sont polymorphiques à 22 sites répartis tout au long de la séquence (Annexe 10). L'haplotype 1' (H1') est le plus commun et correspond au morphotype R, alors que l'haplotype 2' (H2') est lié au morphotype Rlc. Les deux individus du Doubs Db1 et Db3, morphologiquement de la forme R, présentent également, pour le gène mitochondrial COI, l'haplotype (H2') de la forme Rlc. L'haplotype 3' (H3') est associé au morphotype S et est rencontré au sein de la population de la Seine présentant un morphotype particulier.

Les haplotypes H1' et H3' diffèrent par 14 substitutions, les haplotypes H1' et H2' par 18 substitutions et enfin, les haplotypes H2' et H3' par 13 substitutions (Annexe 10).

Par alignement manuel, nous avons trouvé nos séquences du gène COI exactement identiques à certaines séquences accessibles sur GenBank (Figure 17, Annexe 11). Notre séquence de l'haplotype 1' (H1') est identique aux séquences de la forme R de Pigneur *et al.* (subm.) et Pfenninger *et al.* (2002) ainsi qu'à la séquence asiatique de *C. leana* (Japon) et à la séquence de la forme A américaine. La forme Rlc de Pigneur *et al.* (subm.) et *C. subplanata*, une espèce sexuée des fleuves indonésiens, montrent la même séquence du gène COI que notre haplotype 2' (H2'). Cet haplotype 2' se regroupe avec l'haplotype de la forme américaine B. En effet, l'haplotype Rlc (H2') semble être un variant mineur de l'haplotype de la forme B américaine. Entre ceux-ci, seul un site diffère (0,16% de différences). Les séquences de la forme S de Pigneur *et al.* (subm.) et Pfenninger *et al.* (2002) ainsi que la séquence de la forme C américaine, trouvée uniquement en Amérique du Sud, sont identiques à notre haplotype 3'



(H3'). En résumé, les trois haplotypes rencontrés en Europe se retrouvent en Amérique et deux parmi eux (H1' et H2') sont également trouvés en Asie.

Pour construire notre phylogénie, nous avons introduit 23 autres séquences (Annexe 11), dont celle de l'outgroup *Neocorbicula limosa* (Corbiculidae). Ces séquences ont été choisies pour représenter les différents groupes écologiques de *Corbicula* et couvrir l'aire d'origine extrême orientale ainsi que l'aire des sites d'invasion du genre.

Les méthodes d'inférence bayésienne et de Maximum Likelihood donnent des topologies d'arbre très similaires (Figure 17). La phylogénie montre deux clades divergents. L'un comprenant les formes estuariennes (*C. japonica*) et l'autre les formes dulçaquicoles. *C. madagascariensis* forme un taxon frère par rapport aux autres taxons d'eau douce. Au sein du clade dulçaquicole, les formes exclusivement lacustres forment un groupe distinct. À côté de ces espèces lacustres, les formes dulçaquicoles se regroupent en trois clades majeurs, chacun de nos haplotypes européens étant inclus dans l'un d'entre eux (Figure 17A). Il convient cependant de constater que le clade incluant la forme S n'est pas soutenu de fortes valeurs de bootstrap.

On trouve au sein des trois clades majeurs d'eau douce des lignées androgénétiques, mises en évidence par la présence de spermatozoïdes biflagellés. En fait, pour les clades de notre haplotype H1' et de notre haplotype H2', nous constatons que des espèces sexuées et unisexuées cohabitent au sein d'un même clade d'eau douce (Figure 17B).

Au sein du groupe dulçaquicole, certains clades de *Corbicula* ne sont pas supportés par de fortes valeurs de bootstrap. Dès lors, nous avons décidé de construire un réseau à partir des haplotypes de ces formes, à l'exception de celui de *C. madagascariensis*, afin d'approfondir les relations entre ces lignées (Figure 18). Les séquences ont été raccourcies afin qu'elles soient toutes de longueur égale. De ce fait, le pattern de regroupement est quelque peu différent de celui obtenu avec l'arbre phylogénétique. La forme S européenne et *C. australis* ne sont plus regroupées. D'après le réseau, *C. moltkiana* est plus corrélée au cluster de la forme Rlc. Enfin, *C. possoensis* n'apparaît plus comme liée aux autres espèces lacustres. Néanmoins, l'organisation générale des taxons d'eau douce du genre *Corbicula* est confirmée par le réseau.

Il n'est pas pertinent de déterminer le nombre de mutations séparant les différentes séquences à partir de ce réseau. En effet, les séquences ont été fortement raccourcies pour les besoins de cette analyse ce qui a causé une perte d'information.

Les faibles valeurs supportant les branches de cette phylogénie reflètent une grande similitude de séquences du gène mitochondrial COI entre les espèces de *Corbicula* considérées, en particulier les espèces dulçaquicoles. Cette homologie révèle une divergence récente entre ces formes. Afin de déterminer l'époque de divergence des formes européennes, nous avons appliqué le principe de l'horloge moléculaire à cette phylogénie, le taux de mutation du gène COI étant estimé à 0.6% (Baldwin *et al.* 1996). D'après cette vitesse de mutation, les formes R et S auraient divergé il y a environ 3,8 millions d'années et les formes R et Rlc il y a 4,8 millions d'années. Les formes Rlc et S, quant à elles, se seraient séparées il y a 3,4 millions d'années. Ces nombres d'années situent la divergence des formes européennes au Pliocène.

Au terme de ces analyses phylogénétiques, nous pouvons affirmer que seules trois lignées androgénétiques semblent avoir envahi l'Europe.



3.3. MICROSATELLITES

Les 10 loci utilisés dans cette étude sont polymorphiques entre formes (Annexe 12, Tableau 12). En ce qui concerne le locus CIB03, l'allèle 239 est partagé par les trois formes, mais les formes R et S en possèdent un supplémentaire identique (233). Pour le locus CIE01, les formes R et Rlc ont les mêmes allèles. Il en est de même entre les formes S et Rlc pour les loci CIC01, CIA02 et CIB11. En ce qui concerne les loci CIA01 et CIA03, on n'a jamais obtenu d'amplification pour la forme S pour aucun des 6 individus de la forme S de cette étude testés chacun 2 fois. La non-amplification de certains loci de la forme S n'est pas surprenante étant donné que la banque enrichie en microsatellites a été construite pour la forme R (Pigneur *et al.* in press). Trois de ces 10 loci sont hétérozygotes chez toutes les formes (CIC08, CIC01 et CIA02). En plus de ces derniers, les formes R et S possèdent respectivement 3 (CIA03, CIB03, CID12) et 4 autres loci hétérozygotes (CID12, CIC12, CIB11, CIB03), alors que la forme Rlc n'en possède qu'un seul supplémentaire (CIB11).

Dans cette analyse, 81 individus appartenant au morphotype R ont été étudiés, contre 9 pour le morphotype Rlc et seulement 6 pour le morphotype S. A ces spécimens, nous avons encore à ajouter les 2 individus au morphotype intermédiaire de la Seine. De façon tout à fait remarquable, on observe que tous les individus d'un même morphotype présentent exactement les mêmes allèles et ce pour tous les loci considérés (Tableau 12). Plus précisément, les 81 individus du morphotype R venant de 8 populations européennes différentes, à l'exception d'un potentiel hybride (voir plus loin), partagent exactement le même génotype (et haplotype – voir sections 3.1 et 3.2 de ce chapitre). Ceci constitue un résultat remarquable et mérite d'être souligné. Ce résultat est également obtenu au sein du morphotype S et Rlc quoique l'échantillonnage fût restreint à une seule population pour chacun de ces morphotypes.

L'analyse microsatellite nous a permis de mettre en évidence certaines exceptions à l'observation générale énoncée ci-dessus (Tableau 12).

Tout d'abord, nous avons observé des disjonctions « matériel génétique nucléaire-morphotype/ matériel génétique mitochondrial » (Tableau 12). L'individu Db1 du morphotype R du Doubs présente un haplotype mitochondrial Rlc, quel que soit le gène mitochondrial considéré, mais un génotype et un morphotype caractéristiques de la forme R. L'individu Gard 2 (Marescaux 2010, mémoire), quant à lui, montre un haplotype mitochondrial R, quel que soit le gène mitochondrial considéré, mais un morphotype et des marqueurs nucléaires de la forme Rlc (Tableau 12).

Ensuite, étudier les microsatellites nous permet également de mettre en évidence de possibles hybrides entre formes européennes différentes. Les individus de la Seine présentant un morphotype intermédiaire et un haplotype semblable à celui de la forme S se caractérisent par des allèles nucléaires à la fois de la forme R et de la forme S (Tableau 12, Figures 19 et 20), ces derniers étant majoritaires. De façon très intéressante, l'individu Uk3 de Grande-Bretagne présente un haplotype mitochondrial (COI et Cyt b) de la forme R ainsi qu'un morphotype R, mais est caractérisé par des marqueurs nucléaires à la fois de la forme S et de la forme R, ceux-ci étant les plus nombreux (Tableau 12, Figures 19 et 20).

De plus, un individu du morphotype R du Doubs (Db3) étant totalement identique aux autres corbicules de cette population présente un haplotype mitochondrial Rlc et un génotype également caractéristique de la forme Rlc.

Afin de visualiser nos résultats microsatellites, nous avons réalisé une analyse factorielle des correspondances (AFC). Celle-ci permet la détermination de la dépendance entre les variables allèles et formes. Cette analyse (Figure 20) confirme que les hybrides Uk3 (Royaume-Uni), S1 et S2 (Seine) sont intermédiaires aux formes R et S, Uk3 étant plus proche de la forme R



contrairement à S1 et S2 qui sont plus proches de la forme S. Grâce à cette analyse, nous pouvons très vite constater ce que nous voyions déjà lors d'une première lecture des résultats. Certains allèles sont communs à tous les individus. Il s'agit de ceux situés au centre du plan et regroupé dans la lettre B (L311-CIB11, L274-CID12, L239-CIB03, L175-CIC01). Nous remarquons aussi que certains allèles ne sont partagés que par deux formes (L213-CIE01, représenté par la lettre A ; L112-CIA02, représenté par la lettre C...). Finalement, certains allèles permettent de discriminer les 3 formes européennes puisqu'on ne les trouve que chez une d'entre elles (Figure 20, allèles représentés par des chiffres).

Nous pouvons également confirmer ce qui avait déjà été trouvé grâce à nos analyses phylogénétiques et de morphologie de sperme : les populations de *Corbicula* ayant envahi l'Europe semblent clonales (androgénétiques). En effet, sans clonalité, le nuage de point du plan factoriel serait bien plus riche en points, éclaté et homogène. En effet, on peut penser que s'ils étaient sexués, presque tous les 98 individus étudiés ici seraient génétiquement différents et donc seraient représentés par un point différent sur le plan. De plus, le nombre de variables « allèles » serait beaucoup plus important, étant donné la diversité génétique dans les populations sexuées. Or, nous observons une situation dans laquelle tous les individus se groupent en cinq variables (3 formes et 2 hybrides) et où certains allèles sont représentés par le même point (Annexe 15). La dépendance entre forme et allèles est, de plus, importante au regard de la proximité des points sur le plan factoriel.

Enfin, trois allèles sont visibles pour les formes R et S respectivement pour les loci CIA03 et CIC08. Ceci suggère une possible triploïdie, voire une ploïdie supérieure, au sein de ces formes.

4. CARYOTYPAGE

Cette expérience fut assez peu concluante et nécessite encore quelques mises au point. En effet, sur 87 lames étudiées, nous n'avons observé que 6 plaques métaphasiques exploitables (Figure 21). De manière générale, il y a très peu de plaques métaphasiques par rapport au nombre de noyaux visibles. Ces plaques, si elles sont présentes, sont abîmées ou montrent des chromosomes superposés et donc difficilement comptables.

Deux des métaphases exploitables comptait 24 chromosomes, deux autres 34, une 35 et la dernière dénombrait 52 chromosomes (Figure 21).

Néanmoins, étant donné que le nombre haploïde du genre *Corbicula* semble être de 18, le nombre de 24 chromosomes observés pour certaines plaques métaphasiques résulte certainement d'un mauvais étalement. Dès lors, seules les métaphases comptant 34, 35 et 52 chromosomes devraient être prises en compte (Figures 21 et 22).



CHAPITRE 5 - DISCUSSION

1. MORPHOLOGIE

L'analyse en composantes principales de données morphométriques a déjà été utilisée, au sein du genre *Corbicula*, pour réaliser un regroupement d'individus selon leur morphologie (Pfenninger *et al.* 2002, Pigneur *et al.* subm.). Néanmoins, les variables utilisées dans ces études sont différentes des nôtres. Ici, l'ACP nous a permis de mettre en évidence différents groupes morphologiques au sein des populations européennes de *Corbicula* étudiées. Dans une ACP, l'étape de compression des variables corrélées en variables non-corrélées implique une perte d'information. Cette méthode n'est donc pas toujours la meilleure analyse statistique pour regrouper des individus. Cependant, elle présente le grand avantage d'être simple et de permettre un regroupement rapide. En utilisant le logarithme ou les ratios des différentes dimensions mesurées, on limite les biais dus aux différences de taille individuelle.

Notre analyse confirme que les morphotypes R et Rlc ne sont pas distinguables morphométriquement, bien que le morphotype Rlc semble avoir des ratios « hauteur/largeur » et « hauteur/épaisseur » légèrement différent de ceux du morphotype R (Figure 13A, Annexe 6). Néanmoins, cette observation doit être considérée avec précaution. En effet, la proportion d'individus Rlc dans cette étude est trop faible pour pouvoir conclure à un morphotype extrême de la forme R (12 individus du morphotype Rlc contre 162 individus du morphotype R). De plus, les biais liés à la taille individuelle ne peuvent pas être complètement évités. La distinction morphologique entre les morphotypes R et Rlc reste principalement basée sur la couleur de la nacre (Figure 5, Tableau 3). Les populations de la Saône morphotype S et de la Seine forment des clusters distincts du groupe R/Rlc (Figure 13B). Cette distinction est expliquée par la présence d'individus morphologiquement différents des morphotypes R/Rlc particulièrement en ce qui concerne la variable « nombre de stries/hauteur ». Ce résultat n'est pas étonnant puisque les stries fines et serrées de la forme S sont une de ces principales caractéristiques morphologiques (Tableau 3, Brancotte & Vincent 2002, Pfenninger *et al.* 2002, Marescaux *et al.* 2010).

Bien que toutes les populations étudiées ici, à l'exception de celles de la Seine et de la Saône (morphotype S), contiennent des individus de la forme R ou Rlc (Doubs morphotype Rlc), elles présentent toutes des différences conchologiques plus ou moins marquées. Ces variations concernent la morphologie de la coquille, la couleur ou les sculptures. Cette observation confirme la grande plasticité phénotypique observée chez le genre *Corbicula*, comme chez les bivalves en général. Au sein des bivalves, cette plasticité résulte sans doute d'adaptations à différentes conditions environnementales et écologiques (Sousa *et al.* 2007). Ces variations écophénotypiques concernent aussi clairement les palourdes asiatiques du genre *Corbicula* (Lee *et al.* 2005, Sousa *et al.* 2007, Sousa *et al.* 2008a).

L'individu Es 19 du morphotype R se détache du cluster R/Rlc en raison de son faible nombre de stries par rapport à sa taille. Bien que plus grand que les autres juvéniles de cette étude (une hauteur de 13,2 mm contre une hauteur moyenne de 10,17mm), ce spécimen en présente également des attributs tels qu'une coquille plus claire et des marques mauves sur l'umbo. La jeunesse de cet individu pourrait expliquer son rapport « nombre de stries/hauteur » faible. Ceci confirme que l'évaluation de l'âge des palourdes asiatiques du genre *Corbicula* uniquement par la taille n'est pas fiable et qu'il vaut mieux tenir compte du nombre de stries (McMahon 1983, McMahon & Williams 1986).



2. MORPHOLOGIE DES SPERMATOZOÏDES

Trois sortes de spermatozoïdes (sans flagelle, monoflagellés et biflagellés) ont été observées dans toutes les populations étudiées, à l'exception de la population espagnole et de celle de la Saône morphotype R (Tableau 11). Cette absence de sperme peut être liée à la période de récolte des individus. En effet, si la période de récolte ne correspond pas à celle de reproduction, aucun spermatozoïde ne sera présent. Ceci est d'autant plus vrai que la spermatogenèse chez *Corbicula* est un phénomène saisonnier et dépendant de la température de l'eau (Kraemer & Galloway 1986).

Konishi *et al.* (1998) ont décrit les différents stades de la spermatogenèse chez *Corbicula* (spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes), ceux-ci étant très distincts morphologiquement. Les spermatides moyennes pourraient correspondre à ce que nous avons décrit comme spermatozoïde sans flagelle alors que les spermatides tardives pourraient être les spermatozoïdes monoflagellés. En effet, selon ces auteurs, les spermatides ont une tête allongée comme les spermatozoïdes matures et, durant leur dernière phase de développement, le premier flagelle apparaît et commence à croître. Ce que nous avons considéré être des spermatozoïdes avec un très petit flagelle pourrait donc être des spermatides avec un premier flagelle en croissance. Les spermatozoïdes biflagellés que nous avons observés possèdent une tête allongée et deux flagelles approximativement 2,5 fois aussi long que la tête. Ils correspondent aux spermatozoïdes matures tels que décrits par Konishi *et al.* (1998). Nous sommes conscients que les manipulations appliquées pour dégrader les tissus et collecter les spermatozoïdes peuvent avoir causé des cassures de flagelle. Cependant, si cela expliquait l'observation des différents types de spermatozoïde, nous aurions trouvé plus de morphologie de gamètes mâles différentes, telles que des spermatozoïdes avec deux flagelles courts ou avec des flagelles de longueur différentes. Une étude histologique détaillée de la spermatogenèse chez *Corbicula* peut nous aider à résoudre ce problème et déterminer si les spermatozoïdes de palourdes asiatiques sont de vrais biflagellés. En effet, les spermatozoïdes biflagellés peuvent résulter de la fusion de deux gamètes différents (Dallai *et al.* 2001). Cependant, le pairing ne semble pas être l'origine des spermatozoïdes biflagellés chez *Corbicula*. Si tel était le cas, les spermatozoïdes présenteraient probablement deux acrosomes et deux noyaux, ce qui n'est pas le cas chez les palourdes asiatiques (Figure 23, Konishi *et al.* 1998). De plus, un seul pronucléus mâle est observé lors de la fécondation (Komaru *et al.* 1997). Il serait également intéressant de ne récolter que des spermatozoïdes matures en induisant la fraie. Ceci est possible par une augmentation de la température (Komaru *et al.* 2000).

Dans le genre *Corbicula*, la morphologie des spermatozoïdes semble être liée au mode de reproduction. Les espèces gonochoriques avec une reproduction sexuée montrent des spermatozoïdes monoflagellés tandis que les individus androgénétiques et hermaphrodites en présentent des biflagellés (Komaru & Konishi 1996). De plus, la quantité relative d'ADN contenu dans le noyau de spermatozoïdes biflagellés est identique à celle des cellules somatiques (Komaru *et al.* 1997, Komaru & Konishi 1999, Park & Chung 2004). Au sein des Bivalves, les spermatozoïdes biflagellés sont uniques aux corbiculidés androgénétiques (Byrne *et al.* 2000, Kraemer 1983, Komaru & Konishi 1996). Leur morphologie est modifiée par rapport au type de spermatozoïde décrit pour la plupart des bivalves. Ce dernier est monoflagellé et considéré comme ancestral et primitif. Hormis le second flagelle, les modifications sont une tête allongée et une structure ailée le long des flagelles (Komaru & Konishi 1996), qui n'a pas pu être observée dans cette étude. Ces modifications pourraient augmenter l'efficacité de flagellation et la pénétration dans les oocytes.



Mais ces changements morphologiques semblent surtout être associés au mode de reproduction spécialisé qu'est l'androgénèse. En effet, au sein du genre *Corbicula*, on n'a jusqu'à présent observé des spermatozoïdes biflagellés que chez les palourdes androgénétiques (Komaru & Konishi 1996). Néanmoins, les mécanismes évolutifs sous-jacents à l'apparition de ces spermatozoïdes chez les lignées androgénétiques restent inconnus.

La présence de spermatozoïdes biflagellés, même quelques uns, dans toutes les populations européennes de palourdes asiatiques étudiées suggère que l'androgénèse est leur mode de reproduction. Une étude précédente (Marescaux 2010, mémoire) a noté la présence de spermatozoïdes biflagellés chez les trois morphotypes français étudiés R, Rlc et S.

Finalement, nous avons observé des juvéniles, parfois mesurant moins de 10mm, présentant des spermatozoïdes. Cette observation confirme la maturité sexuelle très précoce chez *Corbicula*.

3. ANALYSES GÉNÉTIQUES

3.1. PHYLOGÉNIE MITOCHONDRIALE DE *CORBICULA*

Quel que soit le gène considéré, nos haplotypes couvrent trois lignées mitochondriales phylogénétiquement distinctes (Figures 15 et 17). Sauf de rares exceptions au sein de chacune de ces lignées, tous les individus de toutes les populations étudiées sont identiques pour le gène envisagé et appartiennent à un morphotype donné. Nous nous devons d'insister sur ce résultat marquant: en Europe, on n'observe pas de variation génétique au sein d'un morphotype donné correspondant à une lignée mitochondriale particulière. Par exemple, tous les individus du morphotype R possèdent le même haplotype mitochondrial qui est exclusivement associé à ce morphotype R, cette observation étant vraie pour les autres formes européennes. Ce manque de variation génétique avait déjà été constaté auparavant (Renard *et al.* (2000), Marescaux 2010, Pigneur *et al.* subm.). Au contraire, Pfenninger *et al.* (2002) ont trouvé 43 haplotypes COI différents pour 61 individus. Néanmoins, Pigneur *et al.* subm., après avoir aligné leurs séquences avec celles de Pfenninger *et al.* (2002) montrent que ces dernières présentaient de nombreuses ambiguïtés, notamment au niveau de leur contenu en bases indéterminées (N). Ce manque de variation au sein d'une lignée *Corbicula* a également été observé chez les formes invasives américaines (Siripattawan *et al.* 2000, Lee *et al.* 2005).

On observe aussi une forte similitude de séquences entre les différents haplotypes européens. Cette faible diversité mitochondriale suggère que ces trois formes ont divergé récemment, ce que nous avons confirmé en appliquant le principe de l'horloge moléculaire à la phylogénie basée sur le gène COI. Renard *et al.* 2000 avaient déjà obtenu des dates de divergence entre les formes européennes similaires aux nôtres. Cette similitude de séquences peut être généralisée à toutes les formes de *Corbicula* dulçaquicoles, ce qui justifie les faibles valeurs de bootstrap obtenues en construisant la phylogénie à partir de COI (Figure 17).

Notre laboratoire a été un des premiers à séquencer le gène du Cytochrome b de *Corbicula*. Yamada *et al.* 2010 ont également utilisé les séquences du gène Cyt b pour étudier les relations entre *C. fluminea* et *C. leana* au Japon. Ces auteurs montrent que ces palourdes qui avaient été décrites comme des espèces différentes d'après leur phénotype ne sont en fait pas distinguables du point de vue génétique. Cette étude jette donc un doute supplémentaire sur la taxonomie du genre *Corbicula* et confirme qu'une classification de ce genre uniquement basée sur la morphologie est totalement biaisée.



Notre analyse des séquences du gène mitochondrial Cyt b nous permet de confirmer ce qui avait été auparavant démontré pour le gène COI : la présence de seulement trois haplotypes distincts en Europe (Renard *et al.* 2000, Marescaux 2010, Pigneur *et al.* subm.) ainsi que la dominance de la forme R (Pfenninger *et al.* 2002, Marescaux *et al.* 2010, Pigneur *et al.* subm.). Néanmoins, selon le gène envisagé, la relation entre ces trois lignées diffère légèrement. En effet, si on considère le gène Cyt b, la forme Rlc est la plus proche de la forme R, alors qu'elle est plus proche de la forme S selon la phylogénie par COI. Ceci pourrait être dû à des différences dans les processus de substitutions (synonymes et non-synonymes) entre les deux gènes. Pesole *et al.* (1999) ont mis en évidence une grande variabilité des taux de mutations entre divers gènes mitochondriaux chez les mammifères. D'après leurs résultats, il semble que le taux de substitutions non-synonymes soit celui qui diffère le plus entre les gènes, les gènes cytochrome oxydase étant ceux évoluant le moins rapidement. Néanmoins, il faut remarquer que le nœud liant les formes Rlc et S dans la phylogénie basée sur COI n'est pas supporté par de hautes valeurs de bootstrap.

Pour la phylogénie COI, nous avons inclus des séquences du gène COI de *Corbicula* obtenues via la base de données GenBank (Annexe 11) dans le but de caractériser les relations entre les différents haplotypes rencontrés dans le monde. De façon très intéressante, nous avons pu constater que les mêmes haplotypes sont trouvés en Europe et en Amérique, dans l'aire d'invasion, ainsi qu'en Asie, dans l'aire d'origine du genre *Corbicula*. Ceci avait déjà été, en partie, révélé par de précédentes études (Siripattrawan *et al.* 2000, Hedtke *et al.* 2008).

La forme R, semble être la lignée la plus commune en Europe. En effet, nous observons une beaucoup plus grande fréquence de l'haplotype lié à ce morphotype (74% des individus étudiés génétiquement). De façon remarquable, la forme A, parfaitement identique du point de vue mitochondrial à la forme R, est prédominante sur le continent américain (Lee *et al.* 2005). Cela pourrait être dû à une plus grande capacité d'adaptation écophysiologique de cette lignée qui a envahi l'Amérique du Nord et l'Europe et qui peut atteindre des densités très élevées à certains endroits (jusqu'à 10.000 individus/m² (Cataldo & Boltoskoy 1999)). La forme R pourrait probablement être la première à avoir envahi l'Europe. Une précédente étude de Marescaux *et al.* (2010) a étudié le genre *Corbicula* dans tous les bassins hydrographiques français et également constaté que la forme R était la plus courante ainsi que la plus largement distribuée, alors que les autres formes étaient rencontrées en des lieux bien délimités.

Par ailleurs, les haplotypes R (H1') et Rlc (H2') semblent très proches ou identiques, d'un point de vue génétique, à des formes retrouvées en Asie (Park & Kim 2003) et en Amérique (Siripattrawan *et al.* 2000, Hedtke *et al.* 2008) (Figure 17). Ceci suggère que certaines formes asiatiques natives ont été capables d'envahir l'Amérique et puis l'Europe et s'y développer soit en raison d'une plus grande tolérance écologique ou parce qu'elles étaient originellement établies dans des zones favorisant l'apparition d'espèces invasives : cours d'eau où le trafic fluvial est intense, lieux condensant des activités humaines... La forme S européenne similaire à la forme C américaine ne rencontre aucune correspondance en Extrême Orient (Park & Kim 2003). Cette forme européenne S pourrait néanmoins partager l'haplotype mitochondrial d'une espèce native d'Afrique, d'Asie centrale et du Moyen-Orient, régions qui n'ont pas été étudiées dans ce mémoire.

Les formes américaines et européennes partagent également diverses propriétés biologiques telles que des spermatozoïdes biflagellés et une possible triploïdie (Tableau 8, Lee *et al.* 2005, Hedtke *et al.* 2008, Skuza *et al.* 2008). Tous ces résultats coïncident avec l'hypothèse selon laquelle le genre *Corbicula* serait arrivé en Europe par les eaux de ballast des bateaux en provenance des Amériques (Bachmann 1997, Renard *et al.* 2000). Cependant, il faut signaler qu'il n'y a pas de reflet phénotypique particulier de cette proximité entre les formes européennes et américaines, sauf pour les formes A et R.



Notre phylogénie construite à partir du gène COI, comme le réseau d'haplotypes, ne montre aucun regroupement géographique au sein de genre *Corbicula*. Ceci reflète la distribution cosmopolite du genre (Pigneur *et al.* subm.). Cependant, soulignons que les clades observés semblent clairement correspondre à des préférences écologiques différentes, les formes estuariennes divergeant des formes dulçaquicoles. *C. japonica* est la seule espèce d'eau saumâtre représentée ici, mais l'espèce chinoise *C. fluminalis*, distincte de *C. fluminalis* telle que décrite en Europe, est l'autre représentant connu de ce groupe (Park & Kim 2003). Toutefois, Korniushev 2004 suggère que ces deux dénominations pourraient être synonymes et décrire la même espèce.

Au sein du clade d'eau douce, les formes exclusivement lacustres forment un groupe bien distinct. En effet, les corbicules indonésiennes exclusivement lacustres, *C. anomioides*, *C. matannensis*, *C. loehensis* et *C. possoensis*, forment un groupe monophylétique avec *C. sandai*, une espèce endémique du lac Biwa au Japon (Glaubrecht *et al.* 2003). La répartition des corbicules indonésiennes et des autres clades (Figure 17) suggèrent que la diversité de séquences au sein du genre *Corbicula* est liée à l'écologie et non à la géographie ou au mode de reproduction. En effet, ces espèces indonésiennes présentent une reproduction particulière : elles sont sexuées mais incubent leurs larves (Glaubrecht *et al.* 2003). Néanmoins, *C. javanica* et *C. subplanata*, d'autres représentantes de ces espèces sexuées, se groupent avec des formes androgénétiques, respectivement dans le cluster de la forme R et celui de la forme Rlc (Figure 17). Par contre, ces espèces ne sont pas strictement lacustres et peuvent vivre aussi bien dans des lacs que dans des cours d'eau, comme leurs consœurs européennes et américaines (Glaubrecht *et al.* 2003). De plus, *C. sandai* est le seul représentant connu des palourdes asiatiques sexuées d'eau douce ne montrant pas d'incubation. Néanmoins, elle est phylogénétiquement très proche d'espèces ayant une reproduction différente mais vivant dans des milieux identiques.

Enfin, notre phylogénie démontre clairement que l'androgenèse est apparue indépendamment au sein de chacun des trois principaux clades dulçaquicoles non lacustres. Ce mode de reproduction au sein du genre *Corbicula* est donc polyphylétique. Ceci confirme ce qui avait été observé auparavant par Hedtke *et al.* 2008.

Le clade d'eau douce inclut donc des lignées sexuées et androgénétiques. Les lignées sexuées sont restreintes à la distribution native alors que les formes androgénétiques se sont dispersées avec succès depuis leur aire d'origine en Europe et aux Amériques. De plus, on constate que seule une faible fraction de la diversité génétique présente en Asie est retrouvée dans l'aire d'invasion. Ceci indique que l'androgenèse pourrait donc favoriser l'invasion (Pigneur *et al.* subm.).

3.2. GÉNOTYPAGE DE *CORBICULA* : ANALYSES DE MARQUEURS MICROSATELLITES.

Bien que les loci d'ADN mitochondrial soient souvent utilisés lors d'études phylogénétiques, seuls, ils ne sont pas pertinents pour l'étude d'une espèce androgénétique comme *Corbicula*, en raison des possibles mismatches ADN mitochondrial/ADN nucléaire (voir chapitre 1, section 3.6). Afin d'éclaircir les relations phylogénétiques entre les palourdes asiatiques du genre *Corbicula*, il est impératif d'également sélectionner des marqueurs nucléaires. Nous avons opté pour les microsatellites en raison des nombreux avantages qu'ils présentent : codominance, neutralité face à la sélection, grand polymorphisme, facilité de détection (Reece *et al.* 2004).



Les microsatellites ont été beaucoup utilisés au sein des bivalves (Bierne *et al.* 1998, Geist *et al.* 2003, Reece *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2005) et même chez des bivalves invasifs d'eau douce comme la moule quagga *Dreissena rostriformis* (Therriault *et al.* 2005). Néanmoins, notre laboratoire est le premier à avoir développé des marqueurs microsatellites sur les palourdes du genre *Corbicula* (Pigneur *et al.* subm.). Auparavant, leur génome nucléaire avait été caractérisé par des gènes nucléaires multi-copies (28S et ITS-1) ainsi que du typage d'allozymes (Renard *et al.* 2000, Park *et al.* 2002, Pfenninger *et al.* 2002, Lee *et al.* 2005, Hedtke *et al.* 2008)

Nos analyses des marqueurs nucléaires confirment la présence de trois lignées de palourdes asiatiques en Europe, déjà constatée grâce à la phylogénie mitochondriale. On constate, étonnamment, qu'au sein d'une même forme, absolument tous les individus présentent exactement les mêmes allèles. Pour simplifier, tous les individus appartenant à une même lignée nucléaire (génotype) sont des clones parfaits, chacun étant associé à un haplotype mitochondrial particulier. Ceci indique une absence de divergence génétique entre les populations européennes de *Corbicula* appartenant à la même forme, qui pourrait être mise en relation avec le mode de reproduction de ces animaux (Pigneur *et al.* in press). Par ailleurs, cette surprenante identité de marqueur n'est pas limitée aux seules formes européennes. En effet, les dix marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude permettent également la discrimination des formes américaines. On constate que les individus de la forme A américaine présentent exactement les mêmes allèles que ceux de la forme R européennes (Pigneur *et al.* in press). Toutefois, cette observation doit être confirmée sur un plus grand nombre d'individus américains mais semble, d'ores et déjà, parfaitement confirmer les résultats obtenus pour le génome mitochondrial (Figure 17) et semble suggérer que le même clone invasif se retrouve en Amérique et en Europe (Pigneur *et al.* in press). Par contre, les formes B américaines et Rlc européennes, dont les haplotypes ne diffèrent que d'une paire de bases, ont des génotypes ainsi que des morphotypes très différents (Pigneur *et al.* in press). Dès lors, Pigneur *et al.* subm. suggèrent que ces formes pourraient partager le même ADN mitochondrial à cause de l'androgénèse et du parasitisme des œufs mais descendraient de lignées paternelles différentes.

De tels cas étonnants de non variabilité des marqueurs microsatellites ont été observés chez certaines autres espèces. Chez le puceron du melon *Aphis gossypii*, au sein d'une même classe génotypique, tous les individus présentent exactement les mêmes marqueurs microsatellites (Fuller *et al.* 1999). Schilder *et al.* (1999) ont constaté le même phénomène chez la fourmi *Platythyrea punctata*. Néanmoins, même si plusieurs populations ont été étudiées pour les deux espèces précédentes, la distribution géographique investiguée était assez réduite. Elle comprenait uniquement le Sud de la France dans le cas d'*A. gossypii*, une partie des Caraïbes et la Floride dans le cas de *P. punctata*. De ce fait, on ne peut pas décrire d'espèce animale chez qui l'absence de diversité génétique est si abondamment et largement distribuée (Europe, Amérique, Asie ?) que dans le genre *Corbicula*. De manière également intéressante, la majorité des escargots d'eau douce de l'espèce *Melanoides tuberculata* présentant un morphotype donné ont le même génotype (Samadi *et al.* 1999). Ceci est une situation similaire à celle des palourdes asiatiques du genre *Corbicula*, dans laquelle un morphotype est associé à un génotype particulier, tous les individus étant des clones parfaits au sein d'un même groupe (sauf exceptions, voir plus loin). Il est important de souligner que, comme les corbicules, tous les animaux précédemment cités se reproduisent en partie de façon unisexuée. A côté d'une reproduction sexuée ponctuelle, ils sont tous capables de parthénogenèse. Ce qui renforce encore le lien entre reproduction non sexuée et uniformité génétique.

Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude ont été développés sur la forme R (Pigneur *et al.* in press). On constate toutefois qu'ils peuvent être amplifiés et exploités chez



les autres formes européennes Rlc et S. Ceci renforce la faible diversité génétique entre ces lignées et l'hypothèse selon laquelle elles auraient divergé récemment.

Les microsatellites sont des marqueurs fréquemment utilisés pour étudier la structure génétique d'une population (Balloux & Lugon-Moulin 2002). Ces études de la génétique des populations permettent de caractériser l'évolution d'une population, par exemple de déterminer la migration ou encore le niveau de consanguinité au sein de cette population. Des logiciels, tels qu'Arlequin (Excoffier *et al.* 2005) et GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.* 1996-2004) permettent de calculer les indices standards de génétique de population. Ces logiciels procèdent, entre autres, à des F-statistiques évaluant la diversité génétique au sein d'une population (Weir & Cockerham 1984). Ces logiciels peuvent encore vérifier si l'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté au sein d'une population. Cependant, au sein de chacune des populations de *Corbicula* étudiées dans ce mémoire, tous les individus partagent exactement les mêmes allèles. Cette caractéristique vraisemblablement inhérente aux palourdes asiatiques androgénétiques du genre *Corbicula* rend toute analyse de la génétique des populations inutile. La seule analyse à laquelle nous pouvons procéder est l'évaluation des distances génétiques entre ces populations (Annexe 16).

L'analyse microsatellite nous a également permis de mettre en évidence des phénomènes de mismatch cytonucléaire (Hedtke & Hillis 2011). En effet, l'individu Db1 du Doubs présente un haplotype mitochondrial Rlc, un génotype R et un morphotype R, tandis qu'on observe le contraire pour l'individu Gard 2. Chez les formes américaines, de telles disjonctions ont été observées entre les formes A et B (Lee *et al.* 2005, Hedtke *et al.* 2008) ainsi qu'entre les formes C et B (Lee *et al.* 2005). En Europe, un tel phénomène a également été observé entre les formes R et S vivant en sympatrie dans le Rhin (Pfenninger *et al.* 2002) ainsi qu'entre ces mêmes formes dans la Seine et dans la Meuse (Pigneur *et al.* subm.). C'est donc la première fois ici qu'on observe une disjonction génome nucléaire/génome mitochondrial entre les formes R et Rlc. Dans la rivière Doubs, ces formes vivent en sympatrie, condition nécessaire à l'apparition d'une disjonction. Ces disjonctions sont dues au phénomène du parasitisme des œufs: le sperme androgénétique a la capacité de parasiter les oocytes d'espèces ou de formes proches pour profiter des nutriments maternels tout en étant capable d'en expulser le génome nucléaire. La femelle de l'autre espèce sert alors de mère porteuse, comme c'est le cas chez les phasmes du genre *Bacillus* (Grebelyni 2009). Entre formes proches, cette capacité confère dès lors à celles qui sont androgénétiques un avantage par rapport à celles qui sont sexuées. Au vu des mismatches cytonucléaires décrits au sein du genre *Corbicula*, on peut suggérer que le phénomène de capture d'œuf se produit entre toutes formes vivant en sympatrie et n'est pas limité à certaines formes particulières.

Chez un genre androgénétique comme *Corbicula* où des mismatches cytonucléaires (Hedtke & Hillis 2011) apparaissent, il est impératif de combiner des données mitochondriales et nucléaires afin de discriminer les individus. L'AFC nous a permis de trouver certains allèles discriminants (Figure 20). Néanmoins, le génotypage est coûteux et prend du temps. Comme solution à ces inconvénients, Pigneur *et al.* in press ont montré qu'une simple visualisation sur gel de l'amplification du locus ClC08 permet de différencier les génotypes des différentes formes européennes ainsi que la forme B américaine. Cette visualisation sur gel doit toutefois être couplée avec une analyse traditionnelle des haplotypes mitochondriaux afin de mettre en évidence les mismatches noyau/mitochondrie.

Si on se penche sur l'hétérozygotie des populations étudiées, on constate que, pour les loci envisagés, les formes R et S (respectivement 6/11 et 7/11 loci hétérozygotes) semblent plus hétérozygotes que la forme Rlc (4/11 loci hétérozygotes). Ceci pourrait expliquer pourquoi ces deux premières formes sont les plus répandues en Europe. En effet, l'hétérozygotie au sein de ce genre se reproduisant par reproduction clonale serait, avec de potentielles hybridations et captures partielles de génome (voir chapitre 5, section 3.3), la seule variabilité



génétique. Cela permettrait également de masquer les allèles récessifs délétères. Néanmoins, on ne peut tirer de telles conclusions étant donné le très faible nombre de marqueurs analysés à l'échelle du génome. De plus, certains n'ont pas été amplifiés ou ont donné des résultats ambigus chez certains individus notamment ceux présentant une disjonction (Tableau 12). Il serait cependant intéressant de comparer l'hétérozygotie des palourdes asiatiques asexuées avec celle des sexuées. En effet, on s'attend à observer une augmentation de l'hétérozygotie dans les lignées asexuées. Cette plus grande hétérozygotie a deux raisons principales. Tout d'abord, une hétérozygotie importante peut survenir si les lignées asexuées proviennent de l'hybridation de deux espèces relativement différenciées. Ensuite, l'effet de la divergence mutationnelle est unanimement reconnu. Au sein des lignées asexuées, les deux ou plusieurs allèles d'un même locus évoluent indépendamment et accumulent des mutations différentes au cours du temps. Les microsatellites, en particulier, ont un haut taux de mutation (Birky 1996). D'après Birky (1996), la divergence entre les différents allèles d'un locus permet d'estimer l'âge des lignées asexuées.

3.3. HYBRIDATION

Tous les individus de la Seine étudiés ici montrent un phénotype très atypique mixant des propriétés morphologiques des deux formes R et S. Néanmoins, ces individus ont exactement les mêmes séquences des gènes mitochondriaux que la forme S. Sur base de notre analyse génétique se basant sur les gènes mitochondriaux, ces individus de la Seine appartiennent à la lignée de la forme S, mais pas du point de vue morphologique ni du point de vue des marqueurs nucléaires. Ils montrent, en effet, des allèles à la fois de la forme R et de la forme S. Comme cité dans la section précédente, dans le genre *Corbicula*, des mismatches morphotype/génome mitochondrial avaient déjà été décrits (Lee *et al.* 2005, Hedtke *et al.* 2008, Pigneur *et al.* subm.), ceux-ci correspondent aux disjonctions entre le matériel génétique nucléaire et le matériel génétique mitochondrial que nous avons observées. Dans les études précédentes, des individus ayant le morphotype d'une forme présentaient l'haplotype mitochondrial d'une autre forme mais on n'observait jamais de morphotype intermédiaire entre deux formes. Seuls Pfenninger *et al.* (2002) ont observé un phénomène similaire au nôtre. Sur un certain tronçon du Rhin où les formes R et S vivent en sympatrie, les auteurs ont trouvé des individus du morphotype R, du morphotype S, mais également des individus présentant un morphotype intermédiaire. Tous ces individus sont groupés en seulement deux clades d'haplotypes mitochondriaux, l'un associé au morphotype R et l'autre au morphotype S. Par contre, ces individus sont groupés en trois génotypes, chacun correspondant à un morphotype particulier (Pfenninger *et al.* 2002).

Nos individus de la Seine présentent un génotype mêlant des allèles des formes R et S. De plus, l'individu Uk3 du Royaume-Uni, bien que d'un phénotype et d'un haplotype mitochondrial complètement similaires à ceux de la forme R, présente des allèles nucléaires mixtes entre les formes R et S.

Ces génotypes intermédiaires peuvent être le résultat d'une hybridation entre les deux formes. L'hybridation peut paraître improbable chez ces individus très certainement androgénétiques. En effet, lors de l'androgenèse, le génome maternel est toujours expulsé. Néanmoins, Komaru *et al.* 2006 ont observé chez de rares individus de *C. fluminea* des fécondations tout à fait semblables à celle des espèces sexuées. Dans ce cas, le fuseau méiotique a la même orientation que lors d'une reproduction sexuée, ce qui prévient l'expulsion du matériel génétique maternel. Les pronuclei mâle et femelle sont donc formés. Cette fécondation aberrante pour l'androgenèse pourrait contribuer à la maintenance de la lignée maternelle (Komaru *et al.* 2006). De plus, Hedtke *et al.* (2008) ont décrit des phénomènes de parasitisme des œufs et de capture partielle du génome maternel lors de l'androgenèse. S'il y a



effectivement une extrusion incomplète accidentelle du génome maternel après fécondation d'un ovule par un spermatozoïde androgénétique d'une autre forme de *Corbicula*, on assisterait à une capture partielle du génome nucléaire maternel, la descendance héritant d'ADN nucléaire des deux parents.

Dans ces deux cas, il serait intéressant d'investiguer la ploïdie de ces individus hybrides et de la comparer avec celle des individus de chacun des formes concernées vivant dans la même population. En effet, l'hybridation comme l'extrusion partielle du génome maternel causeraient une élévation de la ploïdie (Komaru *et al.* 2006, Hedtke *et al.* 2008). De fait, par rapport à la situation normale dans l'androgenèse, ces individus hériteraient de chromosomes supplémentaires.

Les deux phénomènes d'hybridation, bien que rares (Hedtke *et al.* 2008), sont possibles pour les individus intermédiaires de la Seine, puisque les formes R et S y vivent en sympatrie (Marescaux *et al.* 2010), condition préalable à l'hybridation comme au parasitisme des œufs. Cependant, en Grande-Bretagne, seule la forme R décrite comme *C. fluminea* semble avoir été répertoriée (Elliott & zu Ermgassen 2008) alors qu'Uk3 possède des allèles des formes R et S. Il faudrait donc investiguer la distribution du genre *Corbicula* en Grande-Bretagne. On peut, en effet, exclure des erreurs d'analyse expliquant le pattern génétique de cet individu. Tant du point de vue mitochondrial que du point de vue nucléaire, Uk3 a été analysé deux fois en obtenant toujours le même résultat. Néanmoins, on ne peut pas rejeter l'hypothèse d'une potentielle contamination lors de l'extraction d'ADN de cet individu. Il faudrait dès lors analyser de nouveau cet individu après une nouvelle extraction.

De façon intéressante, le phénotype de l'individu Uk3 ne permet pas de prédire une potentielle hybridation. Ce spécimen semble, en effet, exactement pareil aux autres représentants du morphotype R. On pourrait parler d'hybridation cryptique (Pfenninger *et al.* 2002).

Les différents « hybrides » de cette étude montrent des haplotypes de formes différentes, l'haplotype S pour les intermédiaires de la Seine et l'haplotype R pour Uk3. Ceci indique que chacune de ces formes peut servir de femelle parasitée.

L'hybridation est rendue possible par la faible divergence génétique entre les trois formes européennes. Dès lors, Pigneur *et al.* subm. suggèrent que *Corbicula* en Europe peut être considéré comme un complexe d'espèces polymorphique comprenant trois groupes distincts.

4. PLOÏDIE

Les individus polyploïdes sont couramment identifiés par comptage des chromosomes et/ou en quantifiant leur contenu en ADN. Le caryotypage, la cytométrie de flux ainsi que le densitométrie Feulgen sont largement utilisés dans ces buts. L'avantage du caryotypage est qu'il donne des informations sur la structure des chromosomes et permet de détecter de l'aneuploïdie. Chez *Corbicula*, la ploïdie ou tout au moins la quantité d'ADN a déjà été déterminée par plusieurs techniques différentes : tout d'abord, la microfluorométrie (Komaru *et al.* 1997, Komaru & Konishi 1998), ensuite le caryotypage (Komaru *et al.* 1997, Park *et al.* 2000, Pfenninger *et al.* 2002, Lee *et al.* 2005, Skuza *et al.* 2009). Néanmoins, la cytométrie de flux peut également être envisagée comme cela a déjà été fait chez divers autres bivalves (Guo & Allen 1994, Rodriguez-Juiz *et al.* 1996).

Les résultats obtenus par caryotypage dans cette étude ne permettent pas de déterminer avec certitude la ploïdie de la forme R en Meuse, faute de métaphases exploitables. De plus, nos résultats suggèrent deux ploïdies possibles : de la triploïdie et de la diploïdie (Figure 22).



Komaru & Konishi 1999 ont obtenu des résultats similaires chez *C. fluminea* dans le fleuve Keelung à Taiwan où ils observent des spécimens triploïdes et diploïdes (Tableau 7). En comparaison, Pfenninger *et al.* (2002) ont trouvé dans le Rhin des individus de la forme R diploïdes. Toutefois, on rencontre en Europe des palourdes triploïdes de la forme S en Pologne (Skuza *et al.* 2009). Les résultats de ce mémoire, en particulier les 3 allèles observés pour le locus ClC08 dans la forme S, vont dans la même direction que ceux de Skuza *et al.* 2009. De plus, lors de l'analyse des microsatellites, nous avons constaté que le locus ClA03 présentait 3 allèles chez tous les individus de la forme R étudiés. Ceci est donc une indication de triploïdie. Les autres loci pourraient également être triploïdes. En effet, le génotypage tel que nous l'avons effectué ne permet pas de dénombrer les allèles si ceux-ci sont similaires. En résumé, si un organisme triploïde est homozygote à un locus, nous n'observons qu'un pic à la taille donnée et non trois. Il paraît logique d'observer de la polyploïdie chez ces organismes à reproduction clonale, comme l'androgénèse. En effet, la polyploïdisation, en fournissant des gènes dupliqués, pourrait assurer la diversification mais aussi avoir un effet de dilution des mutations délétères (Comai 2005).

Les deux ploïdies possibles peuvent être expliquées par le fait qu'au sein de la population de la Meuse, tous les individus ne pourraient pas avoir les mêmes nombres de chromosomes. Cette hétérogénéité de ploïdies dans une population pourrait avoir pour cause la coexistence de palourdes d'origines différentes ou encore l'hybridation et la capture partielle du génome maternel lors de l'androgénèse, comme indiqué dans la section précédente (Komaru *et al.* 2006, Hedtke *et al.* 2008). Les raisons qui viennent d'être citées pourraient également expliquer des variations de ploïdie au sein d'un individu et être liées à notre choix de tissu à utiliser. Rappelons, en effet, que les larves de *Corbicula* androgénétique sont incubées dans les branchies. Or, suite à une hybridation, les cellules du parent et des enfants pourraient avoir des nombres de chromosomes différents.

Bien que notre expérience n'ait pas été concluante, il reste important de réaliser des caryotypes des différentes lignées du genre *Corbicula*. Tout d'abord, le nombre et la morphologie des chromosomes pourrait servir à clarifier la taxonomie de ce genre (Skuza *et al.* 2009). Ensuite, mettre en évidence de la polyploïdie ou une élévation de ploïdie au sein d'une population permet également de confirmer l'androgénèse (Komaru *et al.* 2006). Dans cette optique, les améliorations apportées à notre protocole sont pertinentes. Le principal progrès réalisé est le passage à la culture cellulaire. De fait, l'index mitotique chez *Corbicula* est très faible (Skuza *et al.* 2009). Cependant, nous ne pouvions pas choisir d'analyser les gonades, tissu connu pour se diviser plus, en raison de la ploïdie certainement différente entre les gamètes mâles et les gamètes femelles (Komaru & Konishi 1999, Komaru *et al.* 2006). De nouvelles modifications pourraient toutefois encore être apportées à notre protocole expérimental. Tout d'abord, l'ajout d'un fongicide dans le milieu protégerait mieux nos cultures des contaminations. Ensuite, une synchronisation des cultures cellulaires pourrait augmenter la probabilité d'obtenir des cellules en métaphase lorsqu'on leur injecte la colchicine.



5. ANDROGENÈSE

Tout au long de cette étude, nous avons accumulé des indications d'une reproduction par androgenèse chez les palourdes asiatiques du genre *Corbicula* en Europe. Nous pouvons dès lors conclure avec une quasi-certitude que l'androgenèse est leur mode de reproduction.

Premièrement, nous avons observé des spermatozoïdes biflagellés rencontrés uniquement chez les espèces androgénétiques au sein des palourdes asiatiques.

Deuxièmement, les analyses génétiques révèlent une structure polyclonale de la population de *Corbicula* en Europe, structure très probablement liée à un mode de reproduction non sexué.

Troisièmement, ces mêmes analyses génétiques ont mis en évidence des phénomènes de mismatch morphologie-génome nucléaire/génome mitochondrial. De telles observations sont révélatrices du parasitisme des œufs chez des corbicules androgénétiques (Hedtke *et al.* 2008). Ajoutons qu'au fil de cette étude, il nous est de plus en plus apparu que le parasitisme des œufs chez *Corbicula* n'est peut-être pas un phénomène si rare qu'il n'y paraît. En effet, dans chacun des lieux étudiés pour ce mémoire où différentes formes étaient trouvées en sympatrie, on observe une disjonction génome nucléaire/génome mitochondrial. Ce parasitisme et la potentielle capture partielle du génome maternelle qui en résulte permettrait aux populations androgénétiques de générer de la diversité génétique, étant donné que les génomes nucléaires maternel et paternel sont mêlés et que le génome nucléaire paternel se retrouve associé à un nouveau génome mitochondrial. De plus, en termes de stratégie, parasiter l'ovule d'une autre forme permet d'économiser des ressources allouées à la reproduction.

Quatrièmement, le caryotypage aurait également dû nous renseigner sur le mode de reproduction des corbicules en Europe. Malheureusement, les résultats de caryotype obtenus dans ce mémoire ne permettent pas de renforcer l'hypothèse d'androgenèse. Néanmoins, de la polyploïdie a déjà été observée en Europe (Tableau 8, Skuza *et al.* 2009) et nous avons observé des loci nucléaires avec trois allèles différents.

Pour encore appuyer l'androgenèse, nous devrions nous pencher sur le contenu en ADN des spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes androgénétiques ont la même quantité d'ADN que les cellules somatiques (Komaru *et al.* 1997, Komaru & Konishi 1999). Des études histologiques et cytologiques de la reproduction pourraient également nous aider à confirmer ce mode de reproduction, en visualisant l'expulsion des chromosomes maternels (Komaru *et al.* 1998, Komaru *et al.* 2000). De telles études nous permettraient également de visualiser que seuls les chromosomes dérivés du pronucleus mâle constituent la métaphase de la première division des zygotes (Komaru *et al.* 1998).



6. **SUPER CLONE ET** **“GENERAL PURPOSE GENOTYPE”**

De façon tout à fait remarquable, il apparaît dans cette étude que tous les individus du genre *Corbicula* en Europe ne présentent que trois génotypes. Chacun de ces génotypes est logiquement associé à un morphotype mais également à un haplotype mitochondrial particulier (sauf mismatch cytonucléaire et hybridation). Ajoutons que la forme R européenne est absolument identique à la forme A américaine. Nous pouvons sans aucun doute parler de superclones dans le cas des palourdes asiatiques invasives en Europe et en Amérique. Les superclones sont des génotypes prédominants au sein d'un taxon, largement distribués et persistants dans le temps (Castañeda *et al.* 2010). De plus, on constate que les écosystèmes dulçaquicoles américains et européens ont été envahis par les corbicules androgénétiques, les lignées sexuées semblant retraits à leur aire d'origine.

Des superclones ont également été décrits chez les pucerons du genre *Aphis*, notamment *Aphis gossypii* dont on a discuté dans la section 3.2 de ce chapitre (Fuller *et al.* 1999, Vorburger *et al.* 2003, Castañeda *et al.* 2010). Ces derniers, comme nous l'avons souligné dans la section 3.2 de ce chapitre, se reproduisent par parthénogenèse.

Comment pouvons-nous expliquer la persistance et l'abondance de ces superclones et lignées asexuées ? Bien que l'asexualité apporte un avantage démographique immédiat, on imagine mal le maintien dans le temps de lignées asexuées par rapport à leurs parents sexués. Pour cause, les espèces sexuées auraient des avantages non négligeables en ce qui concerne une adaptation rapide aux changements abiotiques et biotiques de l'habitat (théorie de la reine rouge) et aux mutations délétères (rochet de Müller) étant donné qu'à chaque génération, de nouvelles combinaisons génétiques sont créées et des mutations sont aléatoirement éliminées (Judson & Normack 1996, Vorburger *et al.* 2003).

Une distribution et une capacité d'invasion plus grandes pourraient être dues à une plus grande efficacité de reproduction des lignées asexuées (Van Doninck *et al.* 2002). De plus, chez les asexués hermaphrodites, comme les corbicules androgénétiques, la colonisation est favorisée par le fait qu'un seul individu pourrait potentiellement établir une nouvelle population (McMahon 1991). En effet, chez *Corbicula*, l'autofécondation est possible (Kraemer *et al.* 1986). Néanmoins, le succès de ces superclones peut aussi s'expliquer par leur possession d'un génotype « tout usage », un « General Purpose Genotype » (GPG) (Van Doninck *et al.* 2002, Vrijenhoek & Parker 2009). Le terme GPG a été proposé par Baker (1965) pour décrire les génotypes présentant de larges tolérances environnementales menant à une distribution géographique plus étendue que celle de leurs parents sexués (Vorburger *et al.* 2003, Vrijenhoek & Parker 2009). Ces génotypes sont le résultat d'une sélection clonale dans des environnements temporairement variables, sachant que chez les organismes asexués la sélection agit sur des interactions épistatiques au sein d'un génome complet et non sur des gènes individuels (Vorburger *et al.* 2003, Vrijenhoek & Parker, 2009). Dès lors, après plusieurs générations, la sélection naturelle fixera certains clones ayant une tolérance plus élevée que la moyenne (Vrijenhoek & Parker, 2009). Selon White 1973 in Vrijenhoek & Parker 2009, ces génotypes seraient également particulièrement plastiques phénotypiquement, remplaçant ainsi le polymorphisme génétique par des adaptations physiologiques.

Ce modèle de GPG est parfaitement applicable au genre *Corbicula*, dans lequel seulement trois clones asexués ont envahi et colonisé quasiment tous les écosystèmes d'eau douce en Europe et probablement aussi en Amérique pour l'un d'entre eux.



CHAPITRE 6 - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSION

Trois lignées ou formes de palourdes asiatiques du genre *Corbicula*, au sein desquelles tous les individus sont strictement identiques du point de vue mitochondrial et nucléaire, ont envahi l'Europe avec succès. Bien qu'elles semblent appartenir à un clade différent au sein des espèces dulcicoles, de possibles hybridations font que ces lignées peuvent être considérées comme appartenant à un même complexe polymorphique d'espèces et pourraient même représenter une seule espèce cryptique de *Corbicula*. La grande similitude des séquences des gènes mitochondriaux et des génotypes nucléaires entre ces lignées européennes indique une divergence récente, estimée comme datant du Pliocène.

Etonnamment, ces lignées européennes sont retrouvées en Asie, dans la distribution native, ainsi qu'en Amérique, l'autre zone d'invasion du genre *Corbicula*. Pour l'une d'entre elle (Forme R/A), on peut sans aucun doute parler d'un « superclone » qui aurait colonisé avec succès la quasi-totalité de la distribution actuelle du genre. Ces lignées invasives largement distribuées et ne représentant qu'une faible proportion de la diversité dans l'aire d'origine, montrent en effet un mode de reproduction unisexué très particulier, l'androgénèse. Ceci suggère que l'androgénèse confère un avantage non négligeable sans doute grâce à un avantage reproductif et la possibilité qu'un « clone prometteur » avec des tolérances environnementales élevées (« General Purpose Genotype ») apparaisse et soit maintenu.

De façon très surprenante, ces formes européennes invasives sont toujours, sauf quelques exceptions, une combinaison particulière d'un morphotype, d'un génotype et d'un haplotype. Malgré un morphotype propre à une forme, le genre *Corbicula* est caractérisé par une grande plasticité phénotypique. Cette diversité phénotypique et très certainement physiologique, servirait à compenser un extraordinaire manque de diversité génétique au sein de ces lignées. Ce peu de diversité génétique est lié au mode de reproduction des lignées européennes. De possibles « General Purpose Genotypes » expliqueraient la grande plasticité phénotypique rencontrée au sein du genre *Corbicula* en Europe. En effet, ces génotypes dominants compenseraient le peu de polymorphisme génétique par des adaptations physiologiques.

L'androgénèse peut également contribuer aux exceptions à la règle suivante chez les corbicules invasives : un morphotype particulier est toujours associé aux mêmes haplotype et génotype particuliers. En effet, le parasitisme des œufs avec ou sans capture partielle du génome maternel associe un génotype-morphotype avec un haplotype mitochondrial différent. Bien que ce phénomène complique davantage la taxonomie du genre *Corbicula*, il contribue, avec l'hybridation, à la génération de diversité génétique. Le parasitisme des œufs pourrait également favoriser l'expansion des lignées androgénétiques en leur permettant d'économiser des ressources allouées à la reproduction.

Les formes européennes pourraient également être triploïdes, ce qui, dans le contexte de l'androgénèse, peut leur conférer un avantage en assurant leur diversification mais aussi en diluant les mutations délétères.

En résumé, nous pouvons affirmer que trois clones du genre *Corbicula*, très largement distribués, ont envahi l'Europe. Ces clones tirent certainement leur capacité d'invasion de leur mode particulier de reproduction, l'androgénèse, et de leurs larges tolérances écologiques.



2. PERSPECTIVES

Un des objectifs de ce mémoire était de déterminer les routes d'invasion du genre *Corbicula* en Europe. Notre étude phylogéographique ne nous permet cependant pas encore d'affirmer que l'invasion se soit réalisée d'Asie en Europe en passant par les Amériques comme il est communément pensé (Bachmann 1997, Renard *et al.* 2000). Cette incapacité de tracer une potentielle route d'invasion provient de la similitude génétique entre les formes européennes, américaines et certaines formes asiatiques. De plus, dans la distribution native, seule la situation en Extrême Orient est bien connue. Il nous reste encore à investiguer les populations natives d'Afrique, d'Asie centrale et du Moyen-Orient, en se focalisant surtout sur les zones frontalières entre la distribution native et l'aire d'invasion telles que la Turquie ou le bassin Ponto-Caspien.

Nous avons également comme objectif de déterminer la ploïdie du genre *Corbicula* en Europe. Au vu de précédentes études, de nos résultats de génotypage et de caryotypage, nous pouvons suggérer que les palourdes asiatiques en Europe seraient principalement diploïdes ou triploïdes. Néanmoins, cet aspect doit encore être approfondi en améliorant les techniques de caryotypage ou en passant à d'autres techniques comme la cytométrie de flux. Déterminer la ploïdie des lignées invasives de manière extensive nous permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle les espèces polyploïdes possèderaient une plus grande capacité d'invasion que les espèces diploïdes (Skuza *et al.* 2009).

D'après cette étude, il semble que l'androgenèse soit indissociable voire nécessaire au caractère invasif des palourdes asiatiques du genre *Corbicula*. Cependant, il est possible que certaines formes sexuées soient également invasives. Il faudrait dès lors vérifier, à plus grande échelle, le mode de reproduction des formes invasives (morphologie des spermatozoïdes, ploïdie,...). Une telle étude nous permettrait d'affirmer ou d'infirmer l'hypothèse stipulant que l'androgenèse représente un avantage en termes d'invasion. Dans ce contexte, il faut souligner qu'aucune étude n'a jamais comparé les lignées androgénétiques avec les lignées sexuées, au point de vue de leurs tolérances écologiques, de leur efficacité de reproduction,... Pour l'instant, seule une possible autofécondation tend à prouver que les formes unisexuées sont mieux équipées pour être des envahisseurs efficaces. Il reste donc à analyser plus en profondeur les populations sexuées dans leur distribution native et à les traquer dans les zones envahies.

Dans l'avenir, outre approfondir l'étude des zones frontalières entre la distribution native et l'aire d'invasion, il serait judicieux d'investiguer l'androgenèse dont on ne connaît finalement pas assez pour en comprendre son origine et son évolution au sein du genre *Corbicula*. On peut affirmer que ce mode de reproduction est associé à des spermatozoïdes biflagellés (Komaru & Konishi 1996), à un parasitisme d'œufs et ses conséquences (Hedtket *et al.* 2008) ainsi qu'à une élévation de la ploïdie (Komaru *et al.* 1996, Hedtket *et al.* 2008). De plus, on possède certaines indications sur les mécanismes cytologiques de l'androgenèse (Komaru *et al.* 2000). Néanmoins, les points développés dans les paragraphes suivants doivent encore être éclaircis.

Tout d'abord, ce mémoire démontre que la fécondation d'un ovule d'une forme androgénétique par le spermatozoïde d'une autre forme androgénétique est possible. Toutefois, nous n'avons pu, faute d'échantillons suffisants, établir une fréquence d'hybridation ni affirmer que les spermatozoïdes d'une forme sont plus enclins à parasiter les ovules d'une autre, ou encore si des spermatozoïdes androgénétiques sont capables de parasiter des ovules de formes sexuées. Dès lors, il conviendrait d'analyser les génomes nucléaires et mitochondriaux d'un grand nombre d'individus provenant de populations où différentes lignées sont trouvées en sympatrie. Si on observe bien une forme plus encline à



parasiter les autres, il faudra alors se pencher sur les possibles molécules ou mécanismes favorisant cette attraction. Le maintien de corbicules de différentes formes dans un même aquarium nous permettrait d'observer la « mécanique d'accouplement » de ces animaux. Il semble cependant compliqué de faire se reproduire ces palourdes mais surtout de maintenir leur progéniture vivante en captivité.

Ensuite, nous pourrions confirmer l'androgénèse par des études histologiques et cytologiques de la fécondation, en visualisant l'expulsion des chromosomes maternels. De telles études nous permettraient également de montrer que seuls les chromosomes dérivés du pronucleus mâle constituent la métaphase de la première division des zygotes.

Enfin, nous avons aussi mis en évidence la présence de spermatozoïdes biflagellés mais nous sommes toujours incapables de décrire comment ils sont formés. La première étape devrait être de récolter des spermatozoïdes qui seraient, sans nul doute, des spermatozoïdes matures. Pour ce faire, il suffit de provoquer la fraie par une élévation de la température. Si tous les gamètes récoltés sont biflagellés, une étude histologique détaillée de la spermatogenèse s'imposera afin de déterminer comment apparaît le second flagelle et comment des spermatozoïdes avec une ploïdie similaire aux cellules somatiques sont produits. En effet, des précédentes études présument que les spermatozoïdes biflagellés ne sont pas réduits. (Komaru & Konishi 1996). Nous voudrions donc découvrir le processus qui aboutit, à partir de cellules souches diploïdes, aux spermatozoïdes mâles diploïdes chez les corbicules androgénétiques et à des gamètes mâles haploïdes chez les corbicules sexuées. En parallèle, il serait également pertinent de vérifier la ploïdie des spermatozoïdes biflagellés androgénétiques en Europe où de telles études n'ont jamais été menées. Ceci pourrait être réalisé par cytométrie de flux.

Malgré un éclaircissement de la phylogéographie, de la taxonomie et du mode reproductif du genre *Corbicula* en Europe, il reste encore beaucoup de points à élucider avant que ces animaux ne nous révèlent tous leurs mystères. Parmi ceux-ci, on peut citer les mécanismes d'androgénèse et comment ce mode de reproduction est viable à long terme, les routes d'invasion de ces palourdes, la situation dans les zones de la distribution native non encore bien étudiées,...

Parmi les perspectives citées ci-dessus, certaines font l'objet d'un nouveau projet doctoral de notre unité de recherche.

ANNEXES

Annexe 1 : Origine et morphotype des populations de *Corbicula* étudiées.

Pays	Site	Année	Echantillonneur	Morphotype
Espagne	Bassin du Minho - étangs de Centeans (42°07' N 8°37W)	sept-09	C. Ayres	R
France	Doubs	juil-09	J. Mouthon	R
France	Doubs	juil-09	J. Mouthon	Rlc
France	Seine	avr-09	Marescaux <i>et al.</i> (2010)	Intermédiaire
France	Saône	2009	J. Mouthon	R
France	Saône	2009	J. Mouthon	S
France	Vidourle	2009	P. Laforge	R
Portugal	Estuaire du Lima		R. Sousa	R
Portugal	Estuaire du Minho		R. Sousa	R
Royaume-Uni	Fleuve New Bedford, Sutton Gault	nov-09	N. Spann	R
Suisse	Plage de Gletterens, Lac de Neufchâtel	sept-09	N. Perrin	R

Annexe 2 : Haplotype mitochondrial des populations étudiées par Marescaux 2010 (mémoire).

Individu	Haplotype
C.som1-6	H1 (R)
Mos 1-6	H1
CNB2, CNB5, CNB6	H1
Loi1-3	H1
Cha1, Cha3, Cha5	H1
Tar2, Tar3, Tar4	H1
Her1-3	H1
Gar1-3	H1
Gard2-3	H1
Gard5-6	H1
Gard1	H2 (Rlc)
Gard4	H2

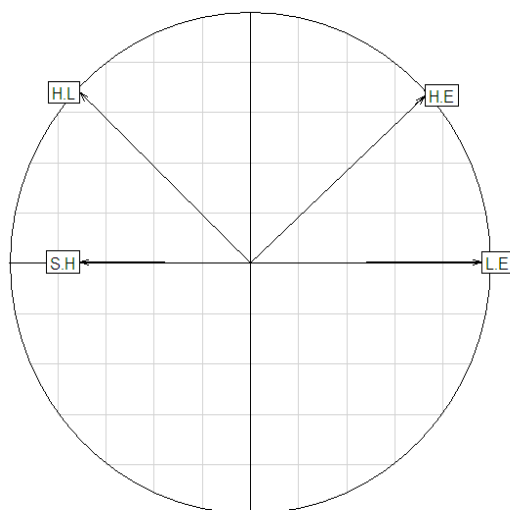
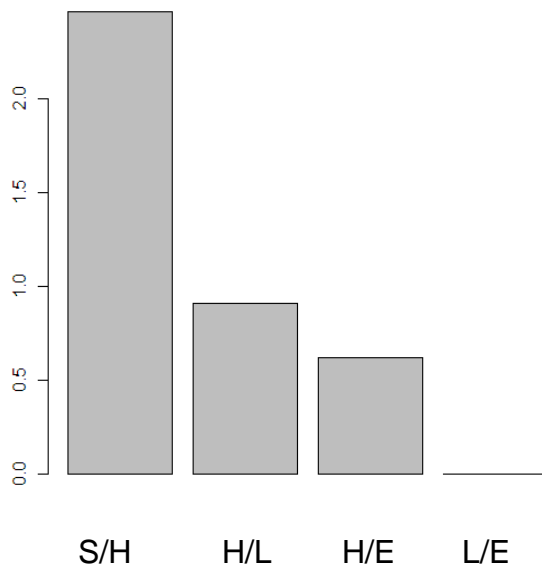
Annexe 3 : Protocole du DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

1. Cut tissue (up to 25 mg) into small pieces, and place in 1,5 ml microcentrifuge tube. Add 180µl Buffer ATL.
2. Add 20µl proteinase K. Mix by vortexing, and incubate at 56°C until completely lysed. Vortex occasionally during incubation, or place in a thermomixer, in a shaking water bath, or on a rocking platform. (Facultative: add 4µl RNase A and incubate at room temperature for few minutes)
3. Vortex for 15s. Add 200µl Buffer AL to the sample. Mix thoroughly by vortexing. Then add 200µl ethanol (96-100%). Mix again thoroughly.
4. Pipet the mixture into a DNeasy Mini spin column in a 2ml collection tube. Centrifuge at $\geq 6000\times g$ (8000rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.
5. Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500µl Buffer AW1. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000\times g$. Discard flow-through and collection tube.
6. Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500µl Buffer AW2. Centrifuge for 3 min at $20000\times g$ (14000rpm). Discard flow-through and collection tube.
7. Transfer the spin column to a new 1,5ml or 2ml microcentrifuge tube, and add 200µl Buffer AE for elution. Incubate for 1min at room temperature. Centrifuge for 1min at $\geq 6000\times g$.

Annexe 4 : Composition du milieu de culture.

- RPMI-1640 avec phénol red
- 15mM HEPES
- 10% FCS (fetal calf serum)
- 2mM L-glutamine
- 100U/ml – 100µg/ml Pénicilline-Streptomycine

Annexe 5 : Graphiques annexes à l'Analyse en Composantes Principales 1 (« nombre de stries/hauteur », « hauteur/largeur », « hauteur/épaisseur » et « largeur/épaisseur »). A. Graphique (histogramme) des valeurs propres, B. Cercle des corrélations selon les composantes principales 1 et 2 et tableau représentant la valeur de ces corrélations.



	Comp1	Comp2
S/H	-0,7111145	0,00584663
H/L	-0,7111086	0,68140915
H/E	0,7246018	0,66818379
L/E	0,9624763	0,00472358

Annexe 6 : Résultats du Test t de Student indépendant comparant la moyenne des variables « nombre de stries/hauteur », « hauteur/largeur », « hauteur/épaisseur » et « largeur/épaisseur » entre les morphotypes R et Rlc (analyse effectuée sur le logiciel R 2.11.0).

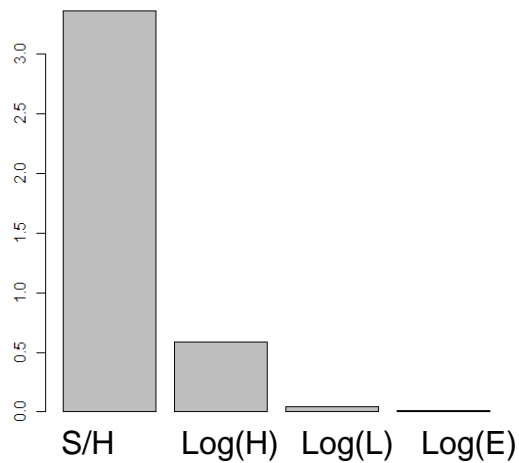
S/H by Forme		
t=-1.3232	df=152	p-value=0.1878
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0		
95 percent confidence interval: -0.24707565 0.04887302		
Mean in group R	1.342525	
Mean in group Rlc	1.441626	

H/L by Forme		
t=4.4295	df=151	p-value=1.803e-05
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0		
95 percent confidence interval: 0.03946928 0.10303199		
Mean in group R	0.9088460	
Mean in group Rlc	0.8375954	

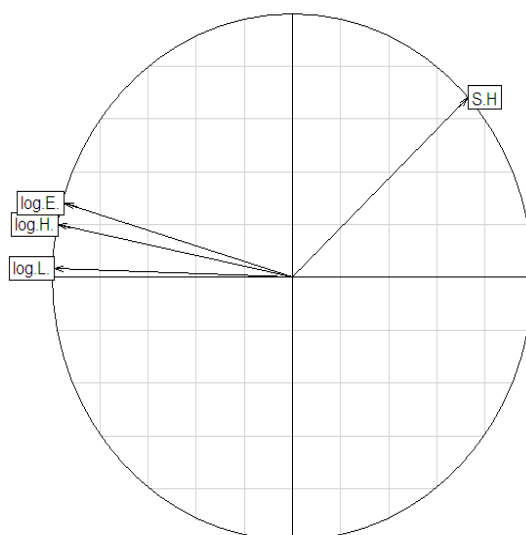
H/E by Forme		
t=3.2891	df=151	p-value=0.001251
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0		
95 percent confidence interval: 0.0421415 0.1689375		
Mean in group R	1.399441	
Mean in group Rlc	1.293901	

L/E by Forme		
t=-0.0959	df=151	p-value=0.9237
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0		
95 percent confidence interval: -0.08678586 0.07874863		
Mean in group R	1.544427	
Mean in group Rlc	1.548446	

Annexe 7 : Graphiques annexes à l'Analyse en Composantes Principales 2
 [« nombre de stries/hauteur », log(hauteur), log(largeur) et log(épaisseur)]. A. Graphique (histogramme) des valeurs propres, B. Cercle des corrélations selon les composantes principales 1 et 2 et tableau représentant la valeur de ces corrélations.



A



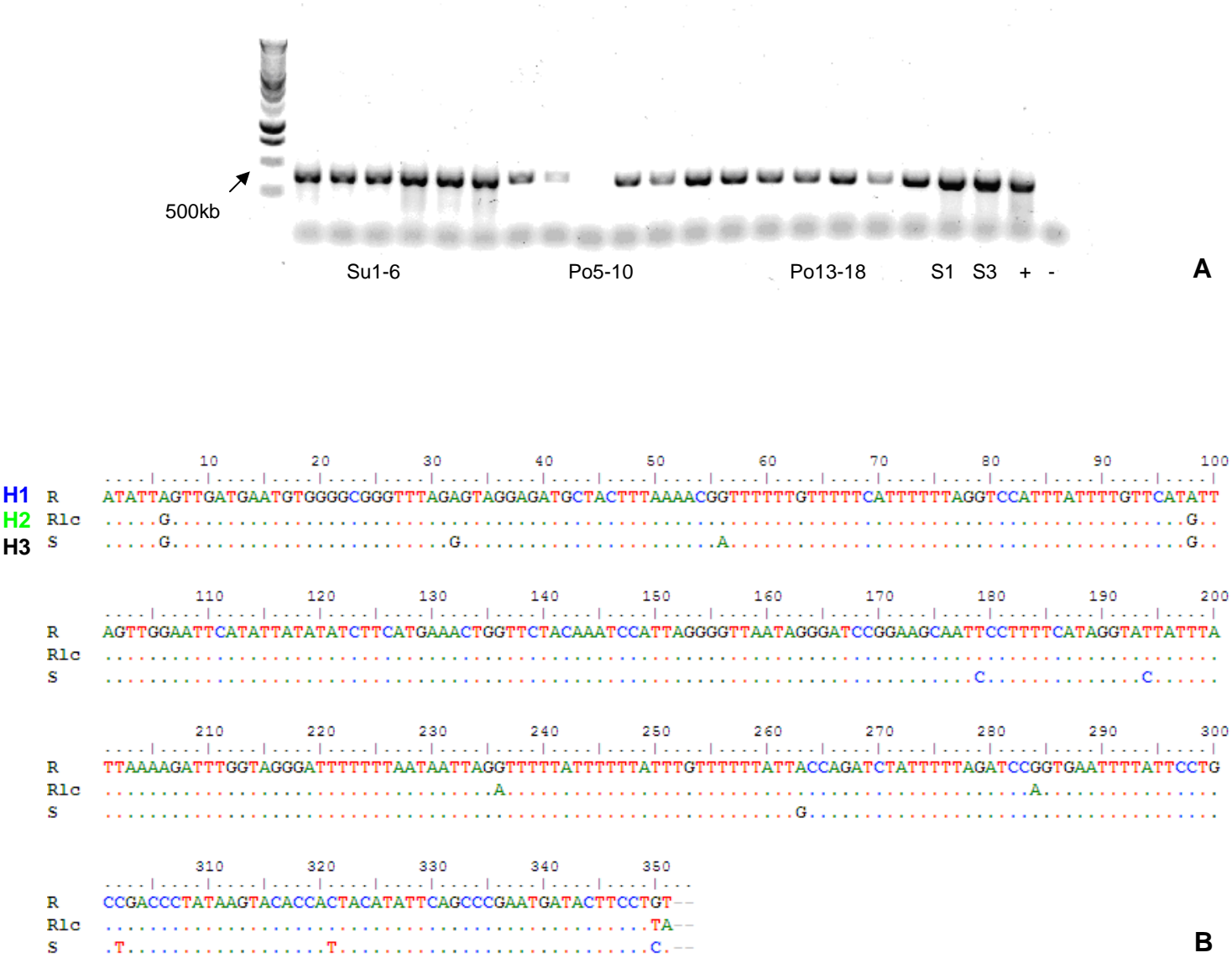
B

	Comp1	Comp2
S/H	0,7296221	0,68253539
log[H]	-0,9740645	0,20042804
log[L]	-0,9891891	0,03521068
log[E]	-0,9468419	0,2829755

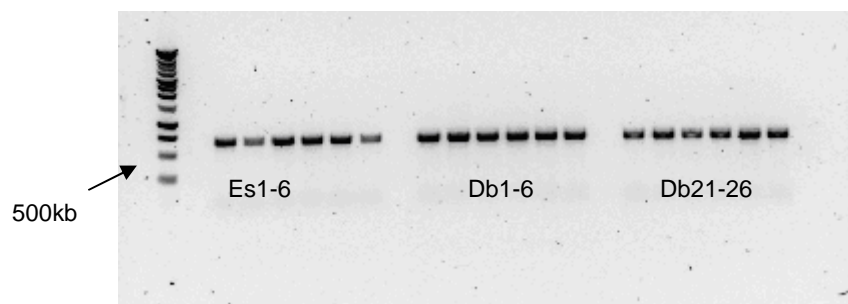
Annexe 8 : Résultats du Test t de Student indépendant comparant la moyenne de la variable « nombre de stries/hauteur » entre les groupes de morphotypes R-Rlc et S-intermédiaires Seine (analyse effectuée sur le logiciel R 2.11.0).

S/H by Forme		
t=-18.3406	df=175	p-value<2.2e-16
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0		
95 percent confidence interval: -1.0917212 -0.8795909		
Mean in group R/Rlc	1.350247	
Mean in group S/Seine	2.335903	

Annexe 9 : Analyses des séquences du gène mitochondrial Cytochrome b (Cyt b). A. Fragment amplifié du gène Cyt b sur gel d’agarose, B. Alignement des séquences des formes R, Rlc et S.



Annexe 10: Analyses des séquences du gène mitochondrial Cytochrome oxydase sous-unité I (COI) A. Fragment amplifié du gène COI sur gel d'agarose, B. Alignement des séquences des formes R, Rlc et S.



A



B

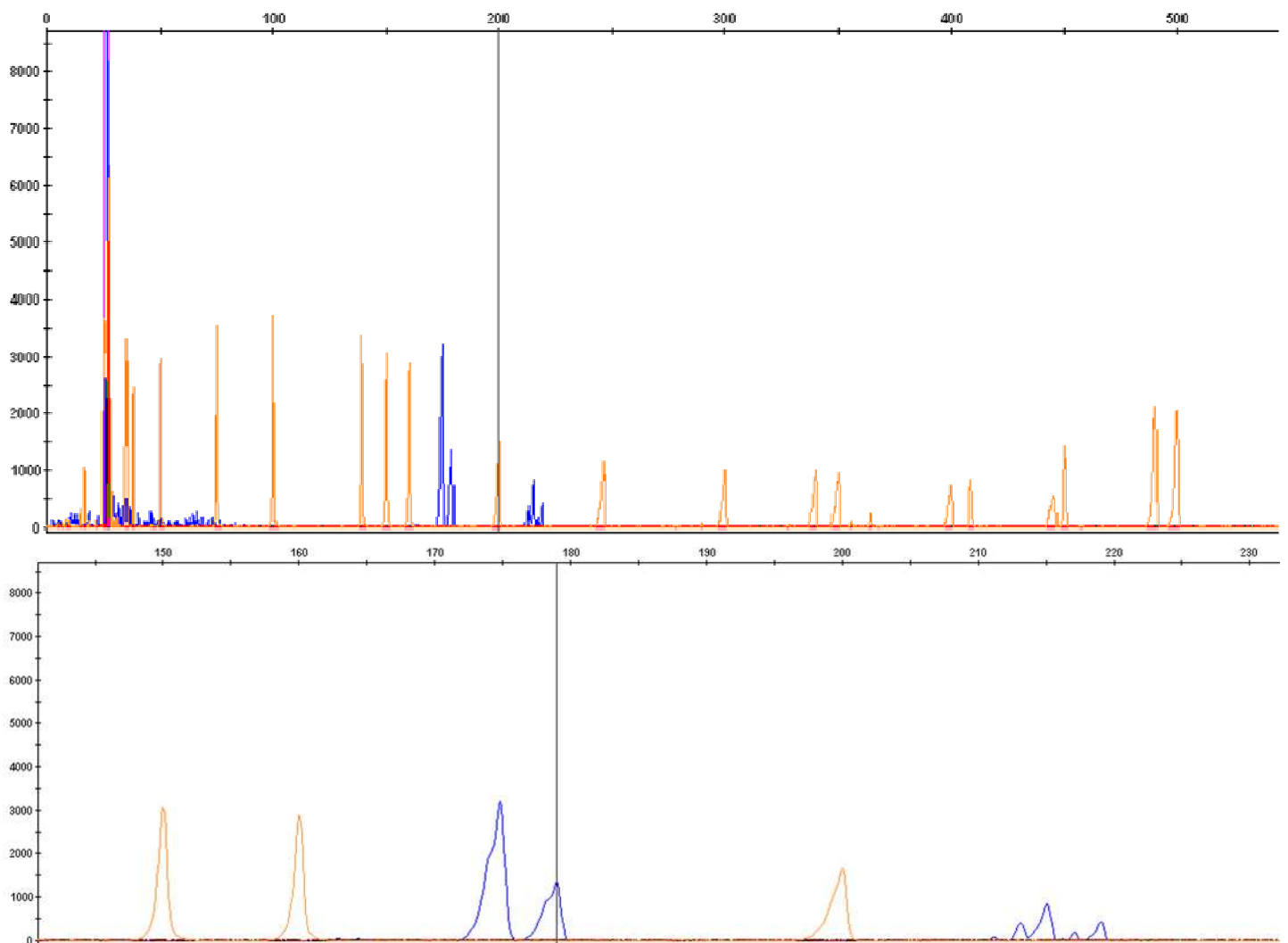
Annexe 11: Séquences accessibles sur GenBank du gène mitochondrial COI d'espèces *Corbicula* et des 2 outgroups utilisées dans cette étude.

Attribution taxonomique	Location	Gène	Numéro d'accession
A Form	USA	COI	AF519495
B form	USA	COI	AF519511
C form	USA	COI	AF519508
R Form	Europe	COI	GU721082
S Form	Europe	COI	GU721083
Rlc Form	Europe	COI	GU721084
<i>Corbicula sp. S</i>	Europe	COI	AY097281
<i>Corbicula sp. R</i>	Europe	COI	AY097275
<i>C. leana</i>	Japon	COI	AF196268
<i>C. sp</i>	China	COI	AF457994
<i>C. sandai</i>	Japan	COI	AF196273
<i>C. japonica</i>	Japan	COI	AF367441
<i>C. australis</i>	Australia	COI	AF196274
<i>C. fluminea</i>	USA	COI	U47647
<i>C. madagascariensis</i>	Madagascar	COI	AF196275
<i>C. javanica</i>	Indonesia	COI	AF457993
<i>C. loehensis</i>	Southeast Asia	COI	AY275666
<i>C. matannensis</i>	Southeast Asia	COI	AY275665
<i>C. anomioides</i>	Indonesia	COI	DQ285605
<i>C. subplanata</i>	Indonesia	COI	DQ285603
<i>C. possoensis</i>	Southeast Asia	COI	AY275662
<i>C. moltkiana</i>	Southeast Asia	COI	AY275657
<i>Neocorbiclua limosa</i>	Argentina	COI	AF196277
<i>Arctica islandica</i>	Norway	Cytb	AF202105

Annexe 12: Caractéristiques des séquences microsatellites étudiées (la PIG-tail est soulignée).

Locus	n° accession GenBank	Motif répété	Amorces (5'-3')	M orphotype	taille de l'allèle (bp)
CIA01	HQ121488	(gt) ₉	F:FAM-GTTTCTTGAGGGATATGGGGTTCAG R:GCGCACGTTTTCTGTGATA	R S Rlc	198 196
CIA02	HQ121489	(tg) ₁₇	F:FAM-GTTTCTTGCTGTTTTCTCTATTGTTGT R:GCTTTTCTATTTAGTGACTCTG	R S Rlc	110-114 112-116 112-116
CIA03	HQ121490	(tg) ₁₄	F:FAM-GTTTCTTGCGAAGGAAATCTGCTA R:ACTGGAAACAGTTCCTCATTTT	R S Rlc	189-192-194 190
CIB03	HQ121491	(ac) ₆ (agta) ₇	F:FAM-GTTTCTTACGATCTTCGTGTTATCAAAG R:TTTAGGTGTTGCTGCATGT	R S Rlc	233-239 233-239 239
CIB11	HQ121492	(ca) ₉	F:FAM-GTTTCTTCCTCTCGTCACGGGCATTT R:CTCTCCCGGCATATTTTTGT	R S Rlc	311 311-313 311-313
CIC01	HQ121493	(gt) ₇	F:FAM-GTTTCTTAATTCATGCAGCTCAAGG R:CTTGCCAACCAGAGCTTA	R S Rlc	175-179 173-175 173-175
CIC08	HQ121494	(ct) ₁₈ (ct) ₈	F:FAM-GTTTCTTGCAAATCGACACAACAGA R:ATCGACAAAAGAGCCATT	R S Rlc	216-220 260-305-315 303-305
CIC12	HQ121495	(ac) ₇	F:FAM-GTTTCTTGCAAATCGACACAACAGA R:ATCGACAAAAGAGCCATT	R S Rlc	226 226-228 230
CID12	HQ121497	(gtgc) ₃	F:FAM-GTTTCTTGCGCAAATTGCGTTACT R:TTTTGAAGAAAAGTGTATGTTG	R S Rlc	274-278 264-274 274
CIE01	HQ121498	(tg) ₈	F:FAM-GTTTCTTAAAACGGGATAGTGACAGAA R:CCAGGTTTGCATTATGTTT	R S Rlc	213 209 213

Annexe 13: Exemple d'électrophérogramme des résultats microsatellites
(Individu Tar3 - loci C01 et C08).



Annexe 14: Analyse factorielle des correspondances : tableau de données.

	L110	L112	L114	L116	L173	L175	L179	L189	L190	L192	L194	L196	L198	L209	L213	L215	L219	L226	L228	L230	L233	L239	L260	L264	L274	L278	L303	L305	L311	L313	L315	
R	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	
Rlc	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	
S	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
Seine1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
Seine2	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
Uk3	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0

Annexe 16: Distances génétiques de Nei 1972 entre les différentes formes européennes et les individus hybrides de la Seine par le logiciel GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.* 1996-2004).

	R	Rlc	Seine	S
R	0	0,705	0,558	0,997
Rlc (9)	0,705	0	1,151	0,817
Seine (2)	0,558	1,151	0	0,245
S (6)	0,997	0,817	0,245	0

Annexe 17: Récapitulatif des analyses génétiques.

	Individu	Haplotype mitochondrial	Génotype
Espagne	Es1	R	R
	Es2	R	R
	Es3	R	R
	Es4	R	R
	Es5	R	R
	Es6	R	R
Doubs, morphotype R	Db1	Rlc	R
	Db2	R	R
	Db3	Rlc	Rlc
	Db4	R	R
	Db5	R	R
	Db6	R	R
Doubs, morphotype Rlc	Db21	Rlc	Rlc
	Db22	Rlc	Rlc
	Db23	Rlc	Rlc
	Db24	Rlc	Rlc
	Db25	Rlc	Rlc
	Db26	Rlc	Rlc
Suisse	Su1	R	R
	Su2	R	R
	Su3	R	R
	Su4	R	R
	Su5	R	R
	Su6	R	R
France , Seine	S1	S	S-R
	S3	S	S-R
Royaume-Uni	Uk1	R	R
	Uk2	R	R
	Uk3	R	R-S
	Uk4	R	R
	Uk5	R	R
	Uk6	R	R

Portugal, Lima	Po5	R	R
	Po6	R	R
	Po7	R	R
	Po8	R	R
	Po9	R	R
	Po10	R	R
Portugal, Minho	Po13	R	R
	Po14	R	R
	Po15	R	R
	Po16	R	R
	Po17	R	R
	Po18	R	R
France, Saône, morphotype R	Sa1	R	R
	Sa2	R	R
	Sa3	R	R
	Sa4	R	R
	Sa5	R	R
	Sa6	R	R
France, Saône, morphotype S	Sa21	S	S
	Sa22	S	S
	Sa23	S	S
	Sa24	S	S
	Sa25	S	S
	Sa26	S	S
France, Vidourle	Vd1	R	R
	Vd2	R	R
	Vd3	R	R
	Vd4	R	R
	Vd5	R	R
	Vd6	R	R



BIBLIOGRAPHIE

- Aldridge D.W. & McMahon R.F. (1978). Growth, fecundity, and bioenergetics in a natural population of the Asiatic freshwater clam, *Corbicula manilensis Philippi*, from North Central Texas. J. moll. Stud. 44:49-70
- Aldridge D.C. & Müller S.J. (2001); The asiatic clam, *Corbicula fluminea*, in Britain : Current status and potential impacts ; Journal of Conchology, Vol.37, No.2
- Aguiar O.Jr, Garda A.A., Lima A.P., Colli G.R., Bão S.N. and Recco-Pimentel S.M. (2003), Biflagellate spermatozoon of the poison-dart frogs *Epipedobates femoralis* and *Colostethus* sp. (Anura, Dendrobatidae), J. Morphol. 255 : 114-21
- Araujo R, Moreno D, Ramos MA (1993) The Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia:Corbiculidae) in Europe. American Malacological Bulletin 10: 39-49
- Astane I., Gosling E., Wilson J. & Powell E. (2005), Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas), Molecular Ecology 14, 1655–1666
- Bachmann V., Usseglio-Polatera P., Cegielka E., Wagner P., Poinssaint J.F., Moreteau J.C. (1997); Premières observations sur la coexistence de *Dreissena polymorpha*, *Corophium curvispinum* et *Corbicula* spp. dans la rivière Moselle; Bull. Fr. Pêche Piscic. (1997) 344/345:373-384
- Bagatini Y.M., de Souza Panarari R., Higuti J., Benedito-Cecilio E., Prioli A.J. and Alves Pinto Prioli S.M. (2005), Morphological and molecular characterization of *Corbicula* (Mollusca, Bivalvia) at Rosana Reservoir, Brazil; Acta Sci. Biol. Sci. Maringá, v.27,n.4, p.397-404, Oct./Dec., 2005
- Baker HG (1965) Characteristics and modes of origin of weeds. In : Baker HG, Stebbins GL (eds) Genetics of colonizing species. Academic Press, New York, pp. 147-172.
- Baldwin BS, Black M, Sanjurjo O, Gustafson R, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1996). A diagnostic molecular marker for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and potentially co-occurring bivalves: mitochondrial COI. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 5, 9–14.
- Balloux F. & Lugon-Moulin N. (2002), The estimation of population differentiation with microsatellite markers, Molecular Ecology 11:155-165
- Bandelt H-J, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations. Genetics 141:743-753
- Baudrimont M., Metivaud J., Maury-Brachet R., Ribeyre F and Boudou F., Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 16, No.10, pp. 2096-2105
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Beran L. (2006), Spreading expansion of *Corbicula fluminea* (Mollusca: Bivalvia) in the Czech Republic, Heliya, Vol.6:187-192
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. & Bonhomme F. (1998), Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae, Genetics, Vol.148, 1893-1906
- bij de Vaate A. & Greijdanus-klaas (1990), The asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Pelecypoda Corbiculidae), a new migrant in the Netherlands, Bulletin zoölogish museum Vol.12 No.12 pp 173-177
- Birky W.C. Jr. (1996), Heterozygosity, Heteromorphy, and Phylogenetic Trees in Asexual Eukaryotes, Genetics 144: 427-437
- Boltovskoy D., Izaguirre I. & Correa N. (1995), Feeding selectivity of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) on natural phytoplankton, Hydrobiologia 312:171-182
- Boroń A., Woźnicki p., Skuza L., Zieliński R., 2004, Cytogenetic characterization of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) from Miedwie Lake, Poland. Folia biol. (Krakow) 52:33-38
- Brancotte V., Vincent T. (2002) ; L'invasion du réseau hydrographique français par les mollusques *Corbicula* spp. Modalité de colonisation et rôle prépondérant des canaux de navigation ; Bull.Fr.Pêche Piscic. (2002) 365/366 : 325-337



- Britton, J. C. & B. Morton (1979). *Corbicula* in North America: The evidence reviewed and evaluated. In: J. C. Britton (ed.), Proceedings, First International Corbicula Symposium, Texas Christian Univ., Fort Worth, Texas. Texas Christian Univ. Res. Found. Publ. pp. 249–287.
- Britton J.C. & Morton B. (1982), A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*, Malacological Review, supplement 3
- Britton J.C. & Morton B. (1986), Polymorphism in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidea) from North America, Malacological Review, 19:1-43
- Byrne M., Phelps H., Church T., Adair V., Selvakumaraswamy P. & Potts J. (2000) Reproduction and developpement of the freshwater clam *Corbicula australis* in southeast Australia; Hydrobiologia 418: 185-197
- Castañeda L.E., Figueroa C., Fuentes-Contreras E., Niemeyer H.M. & Nespolo R.F. (2010), Physiological approach to explain the ecological success of 'superclones' inaphids: Interplay between detoxification enzymes, metabolism and fitness, Journal of Insect Physiology 56:1058–1064
- Cataldo D. & Boltovskoy D. (1999), Population dynamics of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) in the Paraná River Delta (Argentina), Hydrobiologia 380:153-163
- Cataldo D., Colombo J.C., Boltovskoy D., Bilos C., Landoni P. (2001), Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles, Environmental Pollution 112 (2001) 379-389
- CEME (Centre d'Etude et de Modélisation de l'Environnement) – Aquapôle ULG (E.Everbecq, M.T. Bourouag, J.F. Delière, A. Grard, J. Smits) & URBO-FUNDPN (Unité d'Ecologie des Eaux Douces) – (J.P. Descy, L. Viroux), Etude d'incidence de la centrale de Tihange : Impact sur le milieu aquatique (la Meuse), Septembre 2007
- Chen B.Y. & Heneen W.K. (1989), Evidence for spontaneous diploid androgenesis in *Brassica napus* L., Sexual Plant Reproduction 2:15-17
- Ciutti F. & Cappelletti C; (2009), First record of *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774) in Lake Garda (Italy), living in sympatry with *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), J. Limnol., 68(1):162-165
- Cohen R.R.H., Dresler P.V., Phillips E.J.P & Cory R.L. (1984), The effect of the Asiatic clam, *Corbicula fluminea*, on the phytoplankton of the Potomac River, Maryland. Limnol. Oceanogr. 29:170-180
- Comai L. (2005), The advantage and disadvantages of being polyploidy, Nature 6:836-846.
- Cornet M. (1993), A short-term culture method for chromosome preparation from somatic tissues of adult mussel (*Mytilus edulis*), Experientia 49:87-90
- Csányi B. (1999). Spreading invaders along the Danubian highway: first record of *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774) and *C. fluminalis* (O. F. Müller, 1774) in Hungary (Mollusca: Bivalvia). Folia Hist. Nat. Mus. Matr. 23:343-345.
- Dallai R., Lupetti P., Fratti F., Nardi F., Afzelius B.A. (2001), Binucleate and biflagellate spermatozoa in *Tricholepidion gertschi* Wygodzynsky (Insecta, Zygentoma), Tissue & Cell, 33:606-613
- Doherty F.G., Cherry D.S. & Cairns J.Jr. (1987), Spawning periodicity of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* in the New River, Virginia. Am. Midl. Nat. 117 :71-82
- Doherty F.G. (1990), The asiatic clam, *Corbicula* spp., as a biological monitor in freshwater environments, Environmental Monitoring and Assessment 15:143-181
- Dubois, C., Tourenq, J.N. (1995); Etude préliminaire de dynamique des populations de *Corbicula fluminea* (Bivalvia : Corbiculidae) dans la zone profonde d'un canal de la région toulousaine (France) ; Hydroécol. Appl. Tome 7 Vol.1-2 :19-28
- Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O., Kawabata Z-I, Knowler D.J., Lévêque C., Naiman R.J., Prieur-Richard A-H, Soto D., Stiassny M.L. J. and Sullivan C.A. (2006) ; Freshwater biodiversity : importance, threats, status and conservation challenges ; Biol. Rev. 81: 163-182
- Elliott P. & zu Ermgasser P.S.E. (2008), The Asian clam (*Corbicula fluminea*) in the River Thames, London, England, Aquatic Invasions, Volume 3, Issue 1:54-60
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.



- Fournier D., Estoup A., Orivel J., Foucaud J., Jourdan H., Le Breton J., and Keller L. (2005) , Clonal reproduction by males and females in the little fire ant, *Nature*, 435: 1230-1234
- Fuller S.J., Chavigny P., Lapchin L. & Vanlerberghe-Masutti F. (1999), Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France, *Molecular Ecology* 8, 1867-1877
- Geist J., Rottmann O., Schröder W. & Kühn R. (2003), Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionidea), *Molecular Ecology Notes* 3, 444-446
- Gerard A., Naciri Y., Peignon J-M, Ledu C., Phelipot P., Noiret C., Peudenier I. & Grizel H., Image analysis: a new method for estimating triploidy in commercial bivalves, *Aquaculture and Fisheries Management* 25:697-708
- Glaubrecht M., von Rintelen T. & Korniushev A.V. (2003); Toward a systematic revision of brooding freshwater Corbiculidae in Southeast Asia (Bivalvia, Veneroidea): on shell morphology, anatomy and molecular phylogenetics of endemic taxa from islands in Indonesia; *Malacologia*, 45(1): 1-40
- Glaubrecht M., Fehér Z. & von Rintelen T. (2006); Brooding in *Corbicula madagariensis* (Bivalvia, Corbiculidae) and the repeated evolution of viviparity in corbiculids; *Zoological Scripta* 35, 6, 641-654
- Glaubrecht M., Fehér Z. & Köhler F. (2007); Inventorizing an invader: annotated type catalogue of Corbiculidae Gray, 1847 (Bivalvia, heterodonta, Veneroidea), including old world limnic *Corbicula* in the natural history museum Berlin; *Malacologia*, 49(2): 243-272
- Gong N., Yang H., Zhang G., Landau B.J. and Guo X.; Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg ; *Heredity* (2004) 93, 404-415
- Grebelnyi S.D. (2009), Unisexual reproduction: Either Maternal or Paternal Inheritance; *Russian Journal of Developmental Biology*, Vol.39 No.3
- Guindon S. & Gascuel O. (2003), A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood, *Syst. Biol.* 52(5):696–704, 2003
- Guo X. & Allen S.K. (1994), Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), *Biol. Bull.* 187:309-318
- Hakenkamp C.C., Palmer M.A. (1999) ; Introduced bivalves in freshwater ecosystems : the impact of *Corbicula* on organic matter dynamics in a sandy stream; *Oecologia* 119:445-451
- Hakenkamp C.C., Ribblett S.G., Palmer M.A., Swan C.M., Reid J.W. and Goodison M.R. (2001); The impact of an introduced bivalve (*Corbicula fluminea*) on the benthos of a sandy stream; *Freshwater Biology* 46, 491-501
- Hedtke S.M., Stanger-Hall K., Baker R.J. & Hillis D.M. (2008); All-male asexuality: origin and maintenance of androgenesis in the asian clam *Corbicula*; *Evolution* 62-5: 1119-1136
- Hedtke S.M. & Hillis D.M. (2011), The potential role of androgenesis in cytoplasmic-nuclear phylogenetic discordance, *Syst. Biol.* 60(1):87-109
- Hillis D.M. & Patton J.C. (1982); Morphological and electrophoretic evidence for two species of *Corbicula* (Bivalvia: Corbiculidae) in North America; *The American Midland Naturalist*, 108(1): 74-80
- Holland B.S. (2000), Genetics of marine bioinvasions, *Hydrobiologia* 420: 63–71.
- Hornbach D.J., Way C.M., Wissingl T.E. & Burky A.J. (1984), Effects of particle concentration and season on the filtration rates of the freshwater clam, *Sphaerium striatinum* Lamarck (Bivalvia: Pisidiidae), *Hydrobiologia* 108, 83-96
- Howard D.R., Trantow C.M., Thaler C.D. (2004), Motility of a biflagellate sperm: waveform analysis and cyclic nucleotide activation, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 59:120-130 (2004).
- Hubenov Z. (2001), Corbiculidae – a new family for the Bulgarian recent malacofauna (Mollusca, Bivalvia), *Acta zoologica bulgarica* 53 (3):61-66
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001), MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Ishibashi R., Komaru A., Ookubo K. & Kiyomoto M. (2002); The Second Meiosis occurs in Cytochalasin D-treated eggs of *Corbicula leana* even though it is not observed in control androgenetic eggs because the maternal chromosomes and centrosomes are extruded at first meiosis; *Developmental Biology* 244, 37-43



- Ishibashi R. & Komaru A. (2006), Abortive second meiosis detected in cytochalasin-treated eggs in androgenetic diploid *Corbicula fluminea*, *Develop. Growth Differ.* 48, 277-282
- Ituarte, CF (1994), *Corbicula* and *Neocorbicula* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Parana, Uruguay, and Rio de La Plata Basins, *Nautilus*. Vol. 107, no. 4, pp. 129-135.
- Jaillon O. (2004), Aury J-M., Brunet F., Petit J-L, Stange-Thomann N., Mauceli E., Bouneau L., Fischer C., Ozouf-Costaz C., Bernot A., Nicaud S., Jaffe D., Fisher S., Lutfalla G., Dossat C., Segurens B., Dasilva C., Salanoubat M., Levy M., Boudet N., Castellano S., Anthouard V., Jubin C., Castelli V., Katinka M., Vacherie B., Biémont C., Skalli Z., Cattolico L., Poulain J., de Berardinis V., Cruaud C., Duprat S., Brottier P., Coutanceau J-P, Gouzy J., Parra G., Lardier G., Chapple C., McKernan K.J., McEwan P., Bosak S., Kellis M., Volff J-N., Guigó R., Zody M.C., Mesirov J., Lindblad-Toh K., Birren B., Nusbaum C., Kahn D., Robinson-Rechavi M., Laudet V., Schachter V., Quétier F., Saurin W., Scarpelli C., Wincker P., Lander E.S., Weissenbach J. & Roest Crollius H., Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype, *Nature* 431:946-957
- Judson O.P. & Normack B.B. (1996), Ancient asexual scandals, *TREE* 11: 41-46
- Justine J.L., Le Brun N., Mattei X. (1985), The aflagellate spermatozoon of diplozoon (Platyhelminthes : Monogenea : Polyopisthocotylea) : a demonstration case of relationship between sperm ultrastructure and biology of reproduction, *J. Ultrastructure Res.*, 92: 47-54
- Karatayev A.Y., Padilla D.K., Minchin D., Boltovskoy D., Burlakova L.E. (2007a), Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves; *Biol Invasions* 9:161-180
- Karatayev A.Y., Boltovskoy D., Padilla D.K., Burlakova L.E. (2007b), The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts, *Journal of Shellfish Research*, Vol.26, No.1, 205-213
- Khalanski M. (1997), Conséquences industrielles et écologiques de l'introduction de nouvelles espèces dans les hydro-systèmes continentaux : la moule zébrée et autres espèces invasives, *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 344/345 : 385-404
- Kinzelbach R. (1991), Die Körbchenmuscheln *Corbicula fluminalis*, *Corbicula fluminea* und *Corbicula fluviatilis* in Europa (Bivalvia: Corbiculidae), *Mainzer Naturw. Archiv.* 29:S215-228
- Komaru A. & Konishi K. (1996); Ultrastructure of biflagellate spermatozoa in the freshwater clam, *Corbicula leana* (Prime); *Invertebrate Reproduction and Development*, 29:3 193-197
- Komaru A., Konishi K., Nakayama I., Kobayashi T., Sakai H. & Kawamura K. (1997); Hermaphroditic freshwater clams in the genus *Corbicula* produce non-reductional spermatozoa with somatic DNA content; *Biol.Bull* 193: 320-323
- Komaru A., Kawagishi T. & Konishi K. (1998), Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime; *Dev. Genes Evol.* 208:46-50
- Komaru A. & Konishi K. (1999); Non-reductional Spermatozoa in three shell colour types of the freshwater clam *Corbicula fluminea* in Taiwan; *Zoological Science* 16: 105-108
- Komaru A., Ookubo K., and Kiyomoto M. (2000), All meiotic chromosomes and both centrosomes at spindle pole in the zygotes discarded as two polar bodies in clam *Corbicula leana*: Unusual polar body formation observed by antitubulin immunofluorescence. *Dev. Genes Evol.* 210, 263-269
- Komaru A., Kumamoto A., Kato T., Ishibashi R., Obata M. & Nemoto T. (2006); A Hypothesis of ploidy elevation by formation of a female pronucleus in the androgenetic clam *Corbicula fluminea* in the Tone river estuary, Japan; *Zoological Science* 23: 529-523
- Konishi K., Kawamura k., Furuita H., and Komaru A. (1998), Spermatogenesis of the freshwater clam *Corbicula* aff. *fluminea* Müller (Bivalvia: Corbiculidae), *Journal of Shellfish research* Vol.17, No.1,185-189
- Korniushin A.V. & Glaubrecht M. (2003); Novel reproductive modes in freshwater clams: brooding and larval morphology in Southeast Asian taxa of *Corbicula* (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae); *Acta Zoologica* (Stockholm) 84:293-315
- Korniushin A.V. (2004), A revision of some Asian and American freshwater clams assigned to *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774) (Mollusca: Bivalvia: Corbiculidae), with a review of anatomical characters and reproductive features based on museum collections, *Hydrobiologia* 529: 251-270



- Korniushin A.V. (2007), Non-unionid freshwater bivalves (Sphaeriidae, Corbiculidae, Dreissenidae) of North America fauna, *Vestnik zoologii*, 41(1):13 - 22
- Kraemer L.R. & Lott S. (1977); Microscopic anatomy of the visceral mass of *Corbicula* (Bivalvia: Sphaeriacea); *Bulletin of the American Malacological Union, Inc.*, 48-56
- Kraemer L.R. (1983), Ontogenetic aspects of biflagellate sperm in *Corbicula fluminea* (Müller) (Bivalvia: Sphaeriacea), *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 102:88
- Kraemer L.R. (1984), Aspects of the functional morphology of some freshwater bivalve nervous systems: effects on reproductive processes and adaptation of sensory mechanisms in the Sphaericea and Unionacea; *Malacologia*, 1984, 25(1): 221-239
- Kraemer L.R. & Galloway M.L. (1986); Larval development of *Corbicula fluminea* (Müller) (Bivalvia: Corbiculacea): an appraisal of this heterochrony; *American Malacological Bulletin*, Vol. 4(1) (1986): 61-79
- Kraemer L.R., Swanson C., Galloway M. & Kraemer R. (1986); Biological basis of behaviour in *Corbicula fluminea*, functional morphology of reproduction and development and review of evidence for self-fertilization; *American malacological Bulletin*, Special Edition No. 2: 193-201
- Łabęcka A.M., Domagała J., Pilecka-Rapacz M. (2005), First record of *Corbicula fluminalis* (O.F. Muller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae) – in Poland, *Folia Malacol.*, 13 (1): 25-27.
- Lee T., Siripattawan S., Ituarte C.F. & Foighil D.O. (2005); Invasion of the clonal clams: *Corbicula* lineages in the New World; *Amer. Malac. Bull.* 20: 113-122
- Leung B., Lodge D.M., Finnoff D., Shogren J.F., Lewis M.A., Lamberti G. (2002); An ounce of prevention or a pound of cure: bioeconomic risk analysis of invasive species; *Proc. R. Soc. Lond. B* 269, 2407-2413
- Le Marrec- Croq F., Glaise D., Guguen-Guillouzo C., Chesme C., Guillouzo A., Boulo V. & Dorange G. (1999), Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia); *In vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* 39:289-295
- Lombardi J. (1998), *Comparative vertebrate reproduction*, Kluwer Academic Publishers 1998
- Ludyanski M.L., McDonald D. & MacNeil D. (1993), Impacts of the zebra mussel, a bivalve invader. *Bioscience*, 43(8):533 – 544
- Mantovani B. & Scali V. (1992), Hybridogenesis and androgenesis in the stick-insect *Bacillus rossius-grandii benazii* (Insecta, Phasmatodea). *Evolution* 46:783-796
- Marescaux J. (2010), Contribution à l'étude d'une espèce invasive: La palourde asiatique *Corbicula* spp. – Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Département de Biologie, Année académique 2009-2010
- Marescaux J., Pigneur L-M. and Van Doninck K. (2010), New records of Asian clams *Corbicula* spp. (Megerle Von Mühlfeld 1811) in French rivers, *Aquatic Invasions* (2010) Volume 5, Issue 2
- Matos E., Santos M.N.S. & Azevedo C. (2002), Biflagellate spermatozoon structure of the hermaphrodite fish *Satanoperca jurupari* (Heckel, 1840) (Teleostei, Cichlidae) from the Amazon River, *Braz. J. Biol.* 62:847-852
- Mattei X (1988), The flagella apparatus of spermatozoa in fish. *Ultrastructure and evolution. Biol. Cell.* 63:151-158
- McIsaac H.J. (1996), Potential Abiotic and Biotic Impacts of Zebra Mussels on the Inland Waters of North America, *AMER. ZOOL.*, 36:287-299 (1996)
- McKone M.J. & Halpern S.L. (2003); The evolution of androgenesis; *The American naturalist*, vol.161, no.4, 641-656
- McMahon R.F. (1982), The occurrence and spread of the introduced Asiatic freshwater clam, *Corbicula fluminea* (Müller), in North America: 1924-1982, *The Nautilus*, Vol.96:134-141
- McMahon R.F. (1983), Ecology of an invasive pest bivalve, *Corbicula*. *The Mollusca*, Vol.6 Ecology pp. 505-561
- McMahon R.F. & Williams C.J. (1986a), Growth, life cycle, upper thermal limit and downstream colonization rates in a natural population of the freshwater bivalve mollusc, *Corbicula fluminea* (Müller) receiving thermal effluents, *American Malacological Bulletin*, Special Edition No.2 (1986):231-239



- McMahon R.F. & Williams C.J. (1986), A reassessment of growth rate, life span, life cycles and population dynamics in a natural population and field caged individuals of *Corbicula fluminea* (Müller) (Bivalvia: Corbiculacea), American Malacological Bulletin, Special edition No2 (1986):151-166
- McMahon R.F. (2002), Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 59, 1235-1244
- Meijer T. & Preece R.C. (2000), A review of the occurrence of *Corbicula* in the Pleistocene of North-West Europe, Geologie en Mijnbouw / Netherlands Journal of Geosciences 79 (2/3): 241-255 (2000)
- Miller W.A., Atwill E.R., Gardner I.A., Miller M.A., Fritz H.M., Hedrick R.P., Melli A.C., Barnes N.M. & Conrad P.A., Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. In freshwater ecosystems in California, International Journal for Parasitology 35 (2005) 673-684
- Minchin D., *Corbicula fluminea*, Delivering alien invasive species inventories for Europe, 2008
- Miyazaki I. (1936), On the development of bivalves belonging to the genus *Corbicula*. Bull Jpn Soc Fish 5: 249–254 (in Japanese)
- Morgan D.E., Keser M., Swenarton J.T. and Foertch J.F. (2003), Population dynamics of the Asiatic clam, *Corbicula fluminea* (Müller) in the lower Connecticut River: establishing a foothold in New England, *Journal of Shellfish Research*, Vol. 22, No.1, 193-203
- Morton B. and Tong K.Y. (1985), The salinity tolerance of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculoidae) from Hong Kong, Malacological Review Vol. 18, no. 1-2, pp. 91-95
- Morton B. (1986) *Corbicula* in Asia – an updated synthesis. Am. Malacol. Bull. Special Edition 2, 113-124
- Mouthon J. (1981), Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie; Basteria 45: 109-116, 1981
- Mouthon J. (2000), Répartition du genre *Corbicula* Megerle von Mühlfeld (Bivalvia : Corbiculidae) en France à l'aube du XXI^e siècle, Hydroécol. Appl. (2000) Tome 12 Vol. 1-2: 135-146
- Mouthon J. (2001), Life cycle and population dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia : Corbiculidae) in the Saone River at Lyon (France), Hydrobiologia 452 :109-119
- Mouthon J. (2003), Longitudinal and temporal variations of density and size structure of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) populations in the Saône and Rhône rivers (France), Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 39 (1), 15-25
- Moyle P.B. & Light T. (1996), Biological invasion of freshwater: empirical rules and assembly theory, Biological Conservation 78:149-161
- Munjiu & Shubernetski (2010), First record of Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the Republic of Moldova, Aquatic Invasions (2010) Volume 5, Supplement 1: S67-S70
- Nakai K, Matsuda M (2000) Introduced species of freshwater mollusca
- Nguyen L.T.H. & De Pauw N. (2002), The invasive *Corbicula* species (Bivalvia, Corbiculidae) and the sediment quality in Flanders, Belgium, Belg. J. Zool., 132 (1): 41-48
- Obata M., Nishimori K. & Komaru A. (2006), Change of centrosome attachment site causes androgenesis in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: comparison with *C. sandai*, VENUS 65(3):247-257
- Okamoto, A. & Arimoto, B. (1986) Chromosomes of *Corbicula japonica*, *C. sandai* and *C. (Corbiculina) leana* (Bivalvia: Corbiculidae) VENUS (Jap. Jour. Malac.) Vol.45, No.3: 194-202
- Otto S.P. (2007), The evolutionary consequences of polyploidy, Cell 131: 452-462
- Pamplona-Basilio M., Baptista –Farias M., Kohn A. (2001), Spermatogenesis and spermiogenesis in *Didymocystis wedlii* Ariola, 1902 (Didymozoidae, Digenea), Mem Ins Oswaldo Cruz 96: 1153-59
- Park G-M, Yong T-S, Im K-I & Chung E-Y (2000); Karyotypes of three species of *Corbicula* (Bivalvia: Veneroida) in Korea; Journal of shellfish Research, Vol. 19, No. 2, 979-982
- Park J-K, Lee J-S and Kim W (2002), A single mitochondrial lineage is shared by morphologically and allozymatically distinct freshwater *Corbicula* clones, Mol. Cells, Vol. 14, No. 2, pp. 318-322
- Park G-M & Chung E-Y (2003); Molecular phylogenetics of five *Corbicula* species determined by partial 28S ribosomal RNA gene sequences; Journal of Shellfish Research, Vol.22, No. 1, 481-485, 2003



- Park G-M & Chung E-Y (2004); Histological studies on Hermaphroditism, gametogenesis and cyclic changes in the structures of marsupial gills of the introduced asiatic clam, *Corbicula fluminea*, and the Korean clam, *Corbicula leana*; *Journal of Shellfish Research*, Vol. 23, No. 1, 179-184, 2004
- Park J-K & Kim W. (2003); Two *Corbicula* (Corbiculidae: Bivalvia) mitochondrial lineages are widely distributed in Asian freshwater environment; *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 529-539
- Park J-K, Choe B-L and Eom K-S (2004), Two mitochondrial lineages in Korean freshwater *Corbicula* (Corbiculidae: Bivalvia), *Mol. Cells*, Vol.17, No.3, pp.410-414
- Paunović M., Csányi B., Knežević S., Simić V., Nenadić D., Jakovčev-Todorović D., Stojanović B. and Cakić P. (2007), Distribution of Asian clams *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) and *C. fluminalis* (Müller, 1774) in Serbia, *Aquatic Invasions*, Volume 2, Issue 2: 99-106
- Pesole G., Gissi C., De Chirico A. & Saccone C. (1999), Nucleotide Substitution Rate of Mammalian Mitochondrial Genomes, *J Mol Evol* (1999) 48:427–434
- Pfenninger M., Reinhardt F. & Streit B.; Evidence for cryptic hybridization between different evolutionary lineages of the invasive clam genus *Corbicula* (Veneroida, Bivalvia); *J. Evol. Biol.* 15 (2002) 818-829
- Pichot C., El Maataoui, Raddi S., and Raddi P. (2001); Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* 412:39
- Pigneur L.M., Marescaux J., Roland K., Etoundi E., Descy J.P. and Van Doninck K. (submitted), Phylogeny and androgenesis in the invasive *Corbicula* clams (Bivalvia, Corbiculidae) in Western Europe. *BMC Evolutionary Biology*
- Pigneur L.-M., Risterucci A.-M., Dauchot N., Li X. & Van Doninck K. (submitted), Development of novel microsatellite markers to identify the different invasive lineages in the *Corbicula* complex and to assess androgenesis, *Mol Ecol Res.* In press.
- Prashad, B. (1924), Zoological results of a tour in the Far East. Revision of the Japanese species of the genus *Corbicula*, *Memoirs of the Asiatic Society of Bengal*, 6, 522–529.
- Prime, T. 1864. Notes on the species of the family Corbiculidae, with figures. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York* 8:57 92.
- Prime, T. 1866. Notes on the species of the family Corbiculidae, with figures. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York* 8:213 237.
- Popa O.-P., Popa L.-O. (2006) *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834), *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774), *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897) (Mollusca: Bivalvia): alien invasive species in Romanian Fauna. *Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"* 49: 7-12
- Posada D. (2008), jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.
- Qiu A., Shi A. & Komaru A. (2001); Yellow and brown shell color morphs of *Corbicula fluminea* (Bivalvia; Corbiculidae) from Sichuan province, China, are triploids and tetraploids; *Journal of Shellfish Research*, Vol. 20, No. 1, 323-328, 2001
- Queller D. (2005), Males from Mars, *Nature*, Vol 435: 1167-1168
- Quinn et al. (2009), Development of an in vitro culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), *Cytotechnology* 59 :121-134
- Ravera O. & Sprocati A.R. (1997), Population dynamics, production, assimilation and respiration of two fresh water mussels: *Unio mancus*, Zhadin and *Anodonta cygnea* Lam., *Mem. Ist. ital. Idrobiol.*, 56: 113-130
- Reece K.S., Ribeiro W.L., Gaffney P.M., Carnegie R.B. & Allen S.K. Jr (2004), Microsatellite marker development and analysis in the Easter Oyster (*Crassostrea virginica*): confirmation of null alleles and non-mendelian segregation ratios, *Journal of heredity* 95(4):346-352
- Renard E., Bachmann V., Cariou M.L. & Moreteau J.C.; Morphological and molecular differentiation of invasive freshwater species of the genus *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidea) suggest the presence of three taxa in French rivers; *Molecular Ecology* (2000) 9, 2009-2016
- Robinson J.V. & Wellborn G.A., Ecological resistance to the invasion of a freshwater clam, *Corbicula fluminea*: fish predation effects, *Oecologia* (1988) 77:445-452



- Rodriguez-Juiz A.M., Torrado M., Méndez J., Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry, *Marine biology* 126:489-497
- Rozas, J. and Rozas, R. (1995), DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data, *Comput. Applic. Biosci.* 11: 621-625.
- Samadi S., Mavárez, Pointier J-P., Delay B. & Jarne P. (1999), Microsatellite and morphological analysis of population structure in the parthenogenetic freshwater snail *Melanoides tuberculata*: insights into the creation of clonal variability, *Molecular Ecology* 8, 1141-1153
- Sandes N.J., Gotelli N.J., Heller N.E., and Gordon D.M. (2003); Community disassembly by an invasive species; *PNAS*, Vol.100, no.5, 2474-2477
- Schilder K., Heinze J., Gross R. & Hölldobler (1999), Microsatellites reveal clonal structure of populations of the thelytokous ant *Platythyrea punctata* (F.smith) (Hymenoptera; Formicidae), *Molecular ecology* 8, 1497-1507
- Schmidlin S. & Baur B. (2007), Distribution and substrate preference of the invasive clam *Corbicula fluminea* in the river Rhine in the region of Basel (Switzerland, Germany, France)., *Aquat. Sci.* 69:153-161
- Siripattawan S., Park J-K., & Foighil D.O. (2000), Two lineages of the introduced Asian freshwater clam *Corbicula* occur in North America, *J. Molluscan Stud.* 66:423-429
- Skuza L., Łabęcka A.M. and Domagała J. Cytogenetic and Morphological Characterization of *Corbicula fluminalis* (O.F. Müller, 1774) (Bivalvia: Veneroida: Corbiculidae): Taxonomic Status Assessment of a freshwater Clam; *Folia biologica* (Kraków), vol.57 (2009), No 3-4
- Son MO (2007b), Invasive mollusks in fresh and brackish waters of Northern Black sea Region. Odessa, 132 pp
- Sousa R., L. Guilhermino L., Antunes C. (2005), Molluscan fauna in the freshwater tidal area of the River Minho estuary, NW of Iberian Peninsula, *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 2005, 41 (2), 141-147
- Sousa R., Freire R., Rufino M., Méndez J., Gaspar M., Antunes C., and Guilhermmimo L. (2007), Genetic and shell morphological variability of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in two Portuguese estuaries, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74:166-174
- Sousa R., Rufino M., Gaspar M., Antunes C., and L. Guilhermino (2008a) , Abiotic impacts on spatial and temporal distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the River Minho estuary, Portugal, *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 18:98-110
- Sousa R., Antunes C., Guilhermo L. (2008b), Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview, *Ann. Limnol. Int. J. Lim.*, 44(2): 85-94
- Stepien C.A., Taylor C.D. & Dabrowska K.A. (2002), Genetic variability and phylogeographical patterns of a nonindigenous species invasion: a comparison of exotic vs. native zebra and quagga mussel populations, *J. Evol. Biol.* 15: 314-328
- Strayer D.L., Caraco N.F., Cole J.J., Findlay S. and Pace M.L. (1999); Transformation of freshwater ecosystems by Bivalves, *BioScience* Vol.49 No.1, pp. 19-27
- Swinnen F., Leynen M., Sablon R., Duvivier L. & Vanmaele R. (1998), The Asiatic clam *Corbicula* (Bivalvia : Corbiculidae) in Belgium, *Bulletin de l'institut royal des sciences naturelles de Belgique Biologie*, 68 :47-53, 1998
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007), MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0., *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599
- Therriault TW, Orlova MI, Docker MF, McIsaac HJ & Heath DD (2005), Invasion genetics of freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions, *Heredity* 95:16-23
- Tittizer & Taxacher (1997), Erstnachweis von *Corbicula fluminea/fluminalis* (Müller 1774) (Corbiculidae, Mollusca) in der Donau, *Lauterbornia* 31:103-107
- US OTA (1993), Harmful Non-Indigenous Species in the United States, Washington, DC: Office of Technology Assessment, United States Congress.
- Van Doninck K., Schön I., De Bruyn L. & Martens K. (2002), A general purpose genotype in an ancient asexual, *Oecologia* 132:205-212



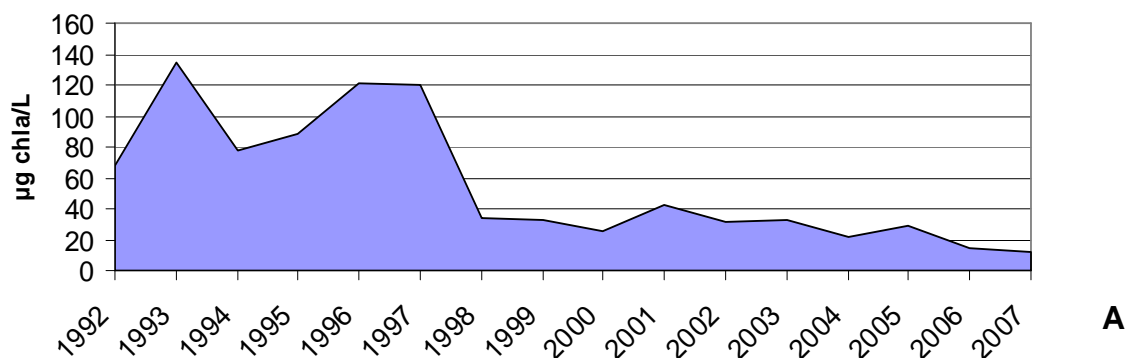
- Vermeij G.J. (1996), An agenda for invasion biology, *Biological Conservation* 78 (1996) 3-9
- Vidal M-L, Bassères A., Narbonne J-F (2002) ; Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller); *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131: 133-151
- Vincent T & Brancotte V. (2000), Le bivalve invasif asiatique *Corbicula fluminea* (Heterodonta, Sphaeriacea, Corbiculidea) dans le bassin hydrographique de la Seine (France) : première prospection systématique et hypothèse sur la colonisation ; *Hydroécol. Appl.* Tome 12 Vol. 1-2, pp. 147-158
- Voelz N.J., McArthur J.V. and Rader R.B. (1998), Upstream mobility of the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: identifying potential dispersal agents, *Journal of Freshwater Ecology*, Vol.13, No.1, 39-45
- von Fischer W. & Schultz P. (1999), Erstnachweis van *Corbicula cf. fluminea* (O.F. Müller 1774) (Mollusca: Bivalvia: Corbiculidae) aus Österreich, sowie ein Nachweis von lebenden *Microcolpia dauderbartii acicularis* (Ferrussac 1821) (Mollusca: Gastropoda: Melanopsidae) aus Bad Deutsch-Altenburg (NÖ, Österreich); *Club conchylia informationen* 31:23-26
- Vorburger C., Lancaster M. & Sunnucks P. (2003), Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two 'superclones' in Victoria, Australia, *Molecular Ecology* 12:3493-3504
- Vrabec V., Ěejka T., Šporka F., Hamerlík L. & Král D. (2003), First record of *Corbicula fluminea* (Mollusca, Bivalvia) from Slovakia with a note about its dispersion in Central Europe, *Biologia*, 58 (5): 942, 952.
- Vrijenhoek R.C. & Parker E.D. (2009), Geographical parthenogenesis: General Purpose Genotypes and Frozen Niche Variation, pgs 99-131 in *Lost Sex* I. Schön, K. Martens & P. Van Dijk, eds., Berlin:Springer Publications
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984), Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution* 38:1358-1370
- Yamada M., Ishibashi R., Kawamura K. & Komaru A. (2010), Interrelationships of the freshwater clams *Corbicula leana* Prime, 1864. and *C. fluminea* (Müller, 1774) distributed in Japan inferred from shell type and mitochondrial DNA Cyt b region, *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 76:5, 926-932
- Yu N. & Culver D.A. (1999), Estimating the effective clearance rate and refiltration by zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, in a stratified reservoir, *Freshwater Biology* 41: 481-492
- Zhang Q., Allen S.K. & Reece K;S., Genetic variation in wild and hatchery stocks of Suminoe Oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers, *Marine biotechnology* Vol.7, 588-599
- Zotin A.A. & Vladimirova I.G. (2001), respiration rate and species-specific lifespan in Freshwater bivalves of Margaritiferidae and Unionidae families, *Biology Bulletin*, Vol.28, No.3, 273-279

FIGURES

Tableau 1: Caractéristiques biologiques de quelques communautés écologiquement importantes de bivalves dulçaquicoles (d'après McMahon 1983, Hornbach *et al.* 1984, Ludyanskiy *et al.* 1993, Boltovskoy *et al.* 1995, Ravera & Sprocati 1997, Strayer *et al.* 1999, Yu & Culver 1999, Zotin & Vladimirova 2001, Karatayev *et al.* 2007b, Korniushev 2007, Sousa *et al.* 2008).

Famille	Biomasse (coquille-masse sèche libre ; g/m ²)	Durée de vie	Taux de filtration (ml.ind ⁻¹ .h ⁻¹)	Fécondité (juvéniles/adulte/an)	Maturité sexuelle
<i>Unionidae</i>	1-10	10 – 20 ans	60,8 - 490	7500 – 25000 parfois jusqu'à 10 ⁶ mais larves ectoparasites obligatoires	3 – 4 ans
<i>Sphaeriidae</i>	0.02-2	1 – 5 ans voire plus	4 - 13	6 - 136	6 mois – 1 an
<i>Corbiculidae</i>	1-30	1 – 5 ans	374-613	En moyenne 68000	3 – 9 mois
<i>Dreissenidae</i>	0.5-20	3 – 5 ans	116 – 234	275000 – 300000 parfois jusqu'à 10 ⁶ œufs/an	3 – 11 mois

Ham-sur-Meuse



Namêche

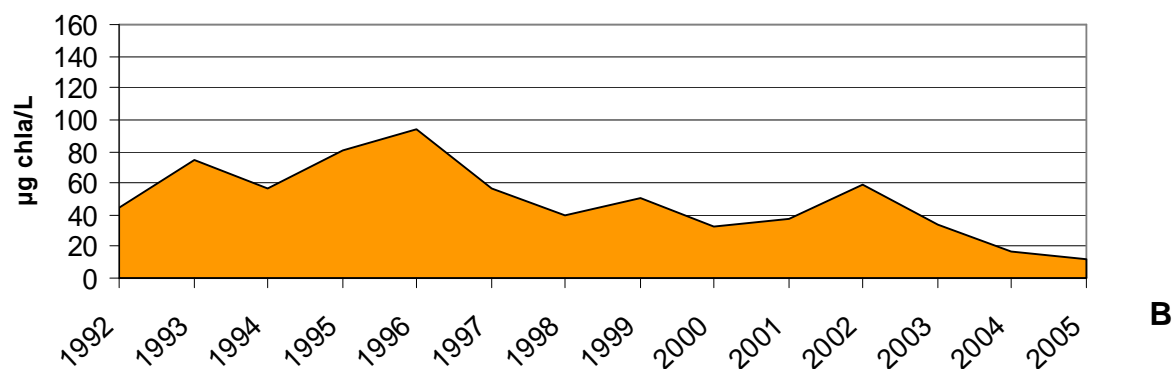


Figure 1: Dynamique du phytoplancton en Meuse, mesurée en quantité de chlorophylle a/litre A. à Ham-sur-Meuse, B. à Namêche (Prof. JP Descy, comm. pers.).



Figure 2: A. Distribution mondiale native (gris clair) et envahie (gris foncé) du genre *Corbicula* (Glaubrecht *et al.* 2007).

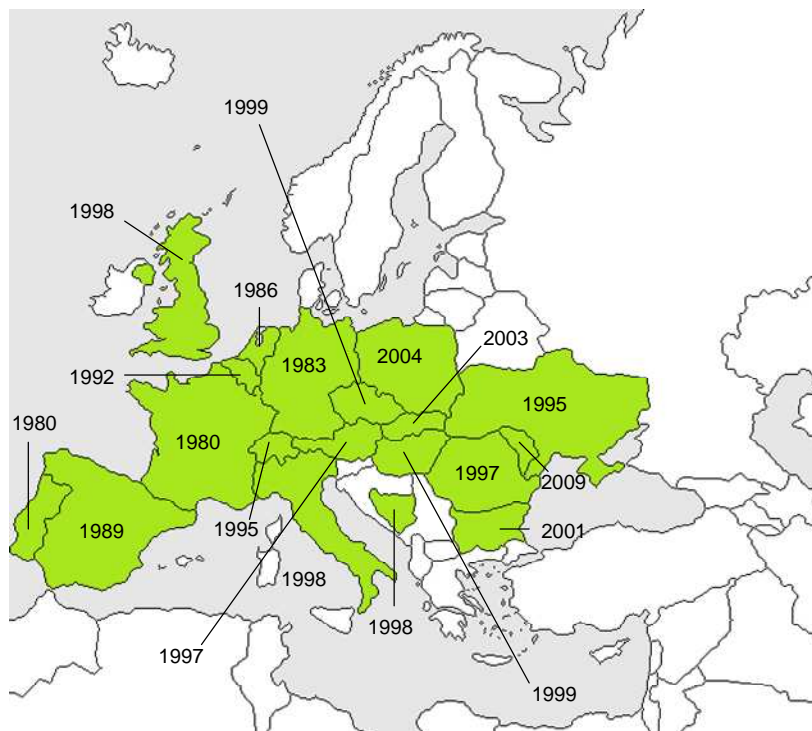


Figure 3: Distribution européenne du genre *Corbicula* et date de son premier enregistrement dans chaque pays.



Tableau 2: Lieux où les différentes formes européennes de *Corbicula* sont trouvées en sympatrie.

Cours d'eau	Pays	Formes en sympatrie	Références
Seine	France	R et S	Marescaux <i>et al.</i> 2010
Gard	France	R et Rlc	Marescaux <i>et al.</i> 2010
Rhône	France	R et Rlc	Pigneur <i>et al.</i> subm.
Moselle	France	R et S	Renard <i>et al.</i> 2000
Meuse	Belgique	R et S	Pigneur <i>et al.</i> subm.
Canal Albert	Belgique	R et S	Swinnen <i>et al.</i> 1998
Canal Bocholt-Herentals	Belgique	R et S	Swinnen <i>et al.</i> 1998
Rhin	Pays-Bas	R et S	Renard <i>et al.</i> 2000
Danube	Allemagne	R et S	Tittizer & Taxacher 1997
Danube	Hongrie	R et S	Csányi 1999
Danube	Serbie	R et S	Paunović <i>et al.</i> 2007
Save	Serbie	R et S	Paunović <i>et al.</i> 2007
Fleuve Oder	Pologne	R et S	Łabęcka <i>et al.</i> 2005
Lac de Garde	Italie	R et S	Ciutti & Cappelletti 2009

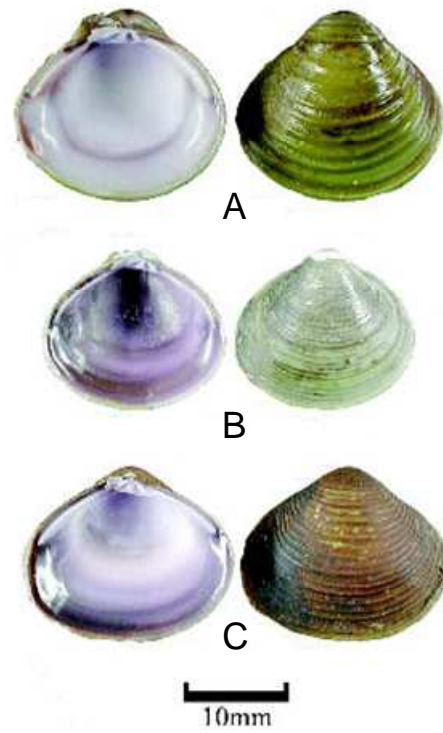


Figure 4: Morphologie des formes américaines. A. Forme A, B. Forme C, C. Forme B (Lee *et al.* 2005).

Tableau 3: caractéristiques morphologiques des formes européennes de *Corbicula*.

Forme	Dimension	Stries	Nacre	Umbo (juvéniles)
R	Largeur>Hauteur	Espacées	Blanchâtre à marques violettes	Stries mauves
Rlc	Largeur>Hauteur	Espacées	Blanchâtre à jaunâtre	Rose-orangé
S	Largeur<Hauteur	Fines et serrées	Mauve foncé	

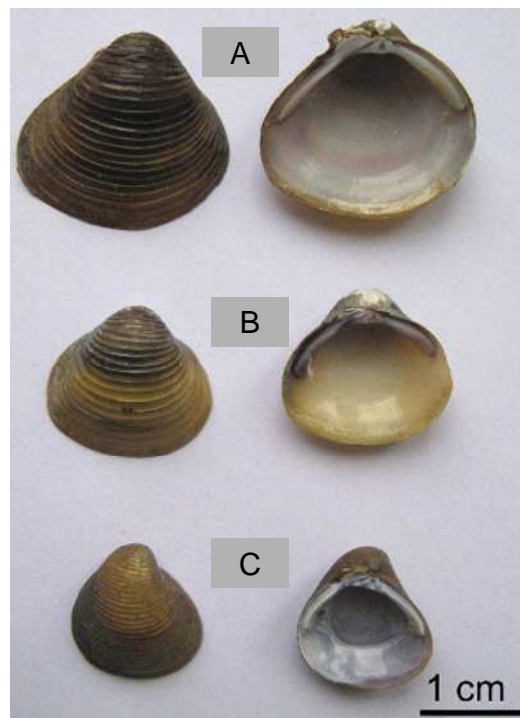
**Figure 5: Vue de la coquille externe et interne des trois formes européennes de *Corbicula*. A. Forme R, B. Forme Rlc, C. Forme S (III) (Marescaux et al. 2010).**

Tableau 4: Caractéristiques biologiques de différentes espèces de *Corbicula* (d'après Myazaki 1936).

<i>C. fluminea, C. fluminalis, C. leana</i>	<i>C. sandai</i>	<i>C. japonica</i>
monoïque vivipare incubation des larves eaux douces	dioïque ovipare pas d'incubation des larves eaux douces	dioïque ovipare pas d'incubation des larves eaux saumâtres

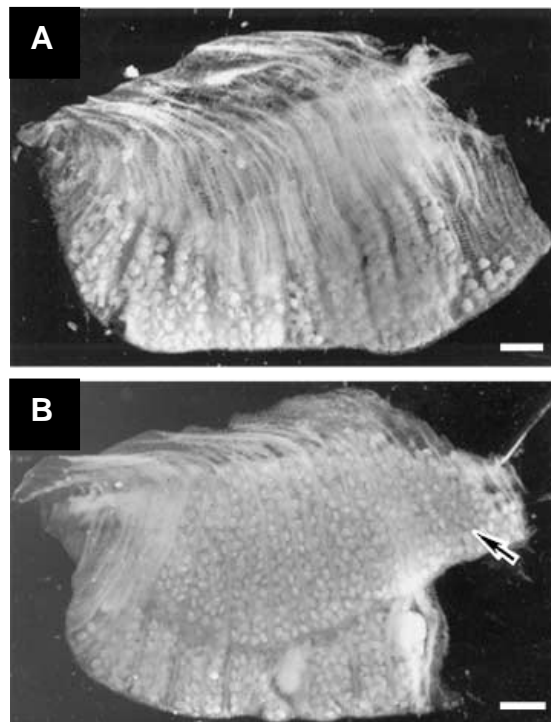


Figure 6: Branchies en période d'incubation. A. *C. matannensis*, B. *C. possoensis*. La flèche indique les larves dans l'hémibranchie externe (Korniushin & Glaubrecht 2003).

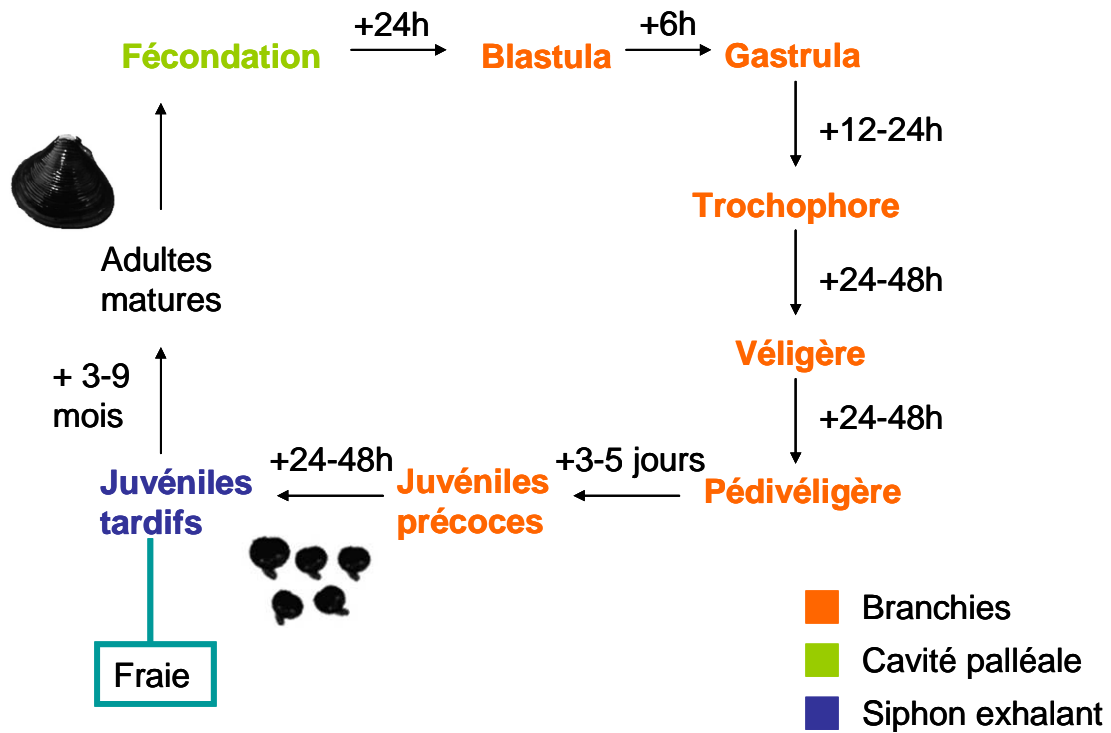


Figure 7: Développement larvaire chez *Corbicula fluminea* (d'après Kraemer & Galloway 1986, Kraemer *et al.* 1986, Sousa *et al.* 2008b).

Tableau 5: Exemples de vertébrés unisexués (d'après Grebelnyi 2009).

Gynogenèse	Le poisson rouge sauvage <i>Carassius auratus gibelio</i>
	Les poissons tropicaux des genres <i>Poecilia</i> et <i>Poeciliopsis</i>
	Les urodèles du genre <i>Ambystoma</i> (individus triploïdes uniquement)
	Les loches de rivière <i>Cobitis</i>
Hybridogenèse	Les poissons du genre <i>Poeciliopsis</i>
	La grenouille verte <i>Rana esculenta</i>

Tableau 6: Comparaison de la gynogenèse et de l'androgenèse en terme de diversité taxonomique (d'après Grebelnyi 2009).

Gynogenèse	Androgenèse
Le poisson rouge sauvage <i>Carassius auratus gibelio</i>	Les palourdes asiatiques du genre <i>Corbicula</i>
Les poissons tropicaux du genre <i>Poecilia</i>	La petite fourmi de feu <i>Wasmannia auropunctata</i>
Les poissons tropicaux du genre <i>Poeciliopsis</i>	Hybrides entre les phasmes <i>Bacillus rossius</i> et <i>Bacillus grandii</i>
Les urodèles du genre <i>Ambystoma</i> (individus triploïdes uniquement)	Le cyprès du Sahara <i>Cupressus dupreziana</i>
Les loches de rivière <i>Cobitis</i> sp.	
Le coléoptère <i>Ptinus mobilis</i>	

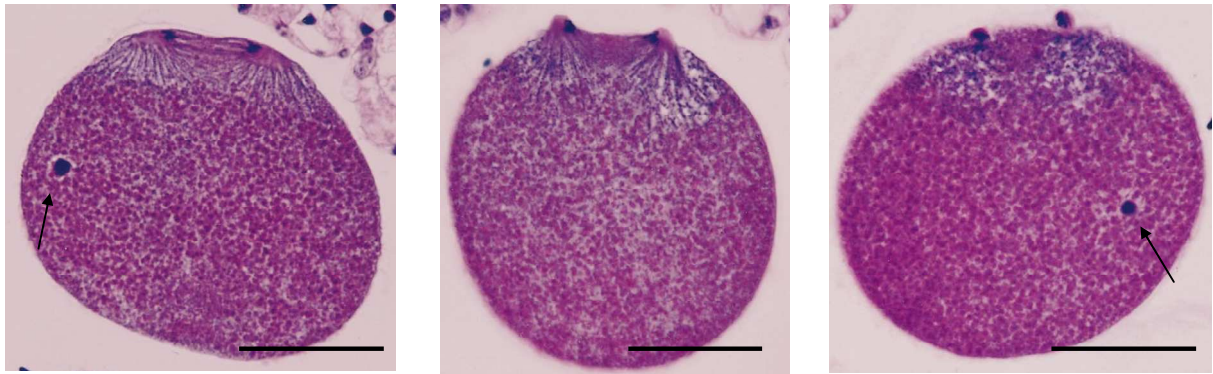


Figure 8: Expulsion du matériel génétique maternel chez *C. leana* (modifié d'après Komaru *et al.* 1998). La flèche montre le pronucleus mâle. La barre d'échelle vaut 50µm.

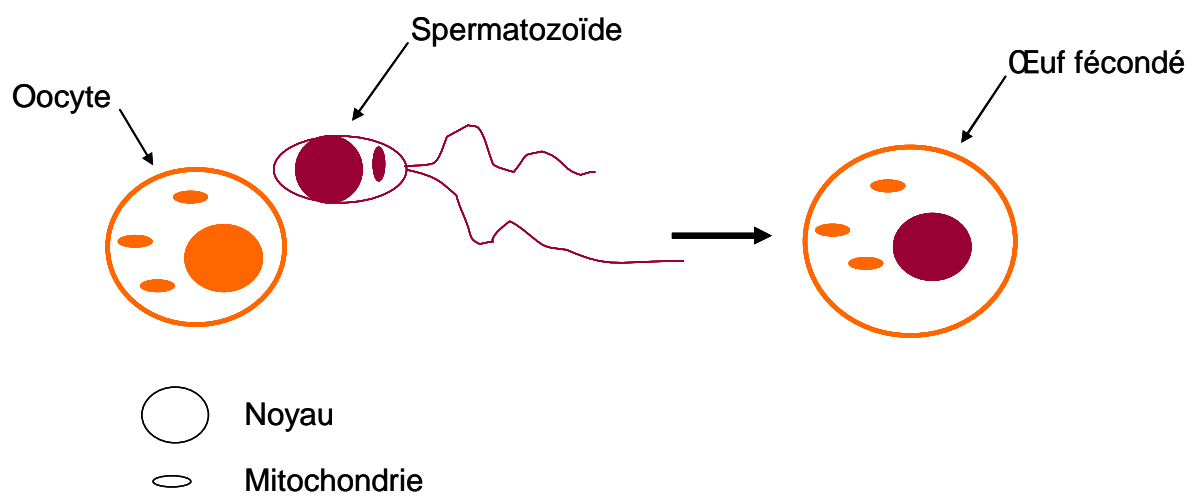


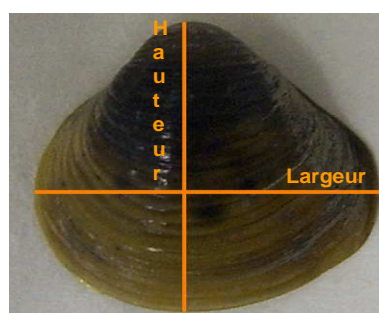
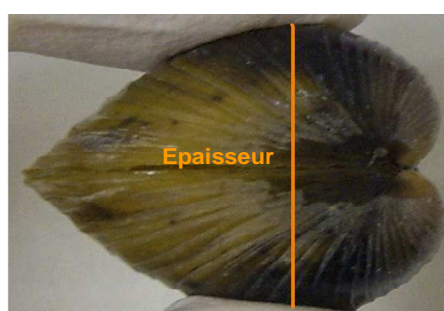
Figure 9: Parasitisme des oeufs et disjonction génome nucléaire-morphotype/génome mitochondrial.

Tableau 7: Caryotypes d'espèces d'Europe, des Etats-Unis et d'Asie (modifié d'après Skuza *et al.* 2009).

Taxons	Origine géographique	Nombre de chromosomes	Références
<i>C. fluminea</i>	Corée, Lac Uiam	54 (3n)	Park <i>et al.</i> 2000
	Chine, région de Anyue	54 (3n)	Qiu <i>et al.</i> 2001
	Chine, région de Anyue	72 (4n)	Qiu <i>et al.</i> 2001
	Japon, crique Shishigatani	2n	Ishibashi <i>et al.</i> 2003
	Taiwan, Fleuve Keelung	2n, 3n	Komaru & Konishi 1999
<i>C. leana</i>	Japon, Lac Biwa	54 (3n)	Okamoto & Arimoto 1986
<i>C. papyracea</i>	Corée, Lac Uiam	54 (3n)	Park <i>et al.</i> 2000
<i>C. papyracea colorata</i>	Corée, réservoir Changpyung Dam	38 (2n)	Park <i>et al.</i> 2000
<i>C. japonica</i>	Japon, Fleuve Yodo	38 (2n)	Okamoto & Arimoto 1986
<i>C. sandai</i>	Japon, Lac Biwa	36 (2n)	Okamoto & Arimoto 1986
<i>C. fluminalis</i>	Pologne, Fleuve Odra	54 (3n)	Skuza <i>et al.</i> 2009
Forme R et S européennes	Allemagne, Fleuve Rhin	36(2n)	Pfenninger <i>et al.</i> 2002
Forme A américaine	USA	54 (3n)	Lee <i>et al.</i> 2005, Hedtke <i>et al.</i> 2008
Forme B américaine	USA	54 (3n)	Lee <i>et al.</i> 2005, Hedtke <i>et al.</i> 2008

Tableau 8: Nombre d'individus étudiés par population pour chacune des analyses et leur morphotype présumé.

Population	Morphotype	Morphologie	Spermatozoïdes	Cytb	COI	Microsatellites
Espagne	R	20	4	6	6	6
Doubs R	R	20	4	6	6	6
Doubs Rlc	Rlc	20	4	6	6	6
Royaume-Uni	R	20	4	6	6	6
Suisse	R	20	4	6	6	6
Portugal (Lima)	R	12	4	6	6	6
Portugal (Minho)	R	20	4	6	6	6
Seine	Intermédiaire	3	2	2	2	2
Saône R	R	19	8	6	6	6
Saône S	S	20	4	6	6	6
Vidourle	R	20	4	6	6	6
Canal de la Somme	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	6
Loire	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	3
Moselle	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	6
Tarn	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	3
Hérault	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	3
Canal Nantes Brest	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	3
Charente	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	3
Gard R	R	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	6
Gard Rlc	Rlc	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	Marescaux 2010	3

**Figure 10: Dimensions mesurées pour l'analyse morphologique.**

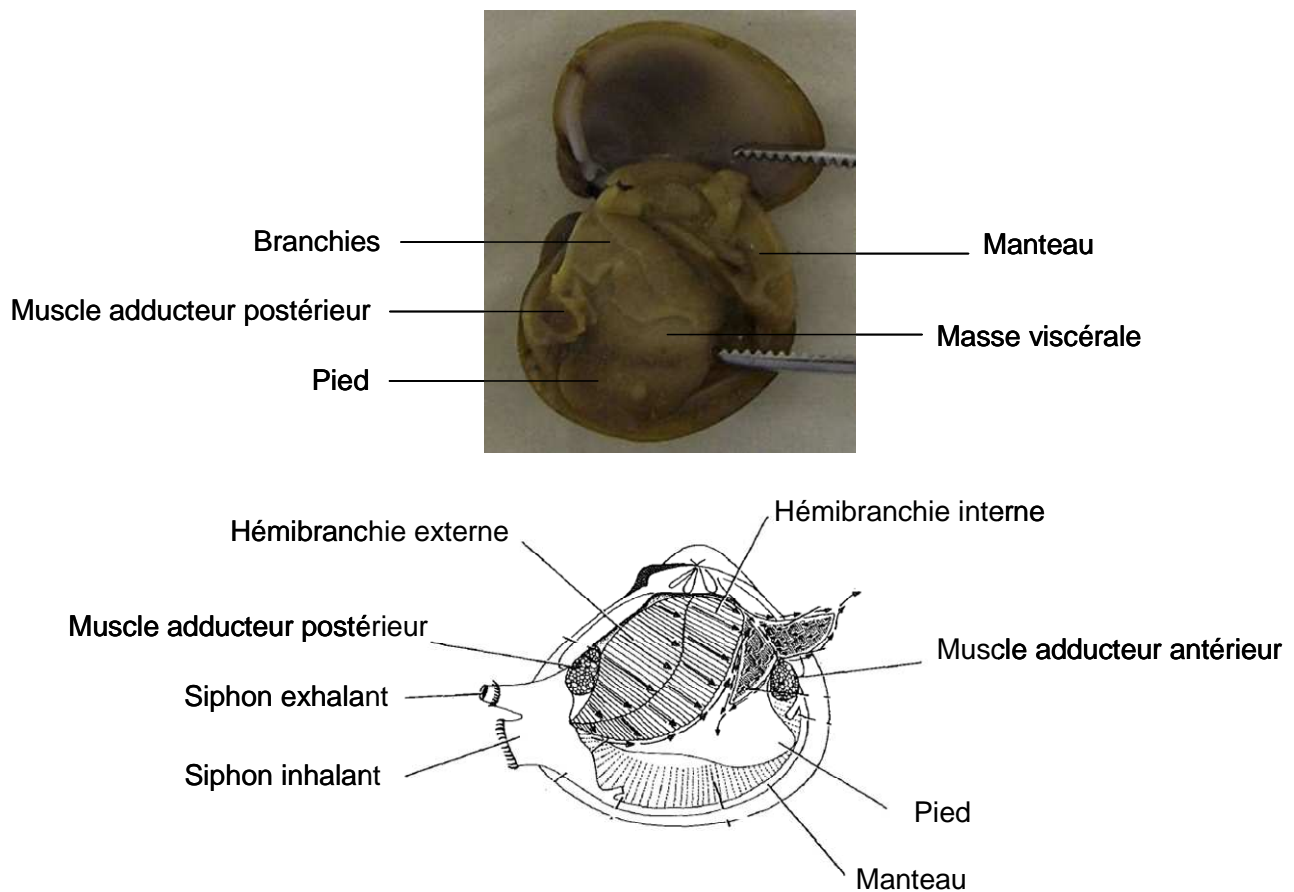


Figure 11: Anatomie des palourdes asiatiques du genre *Corbicula* (d'après Britton & Morton 1982).

Tableau 9: Paramètres PCR des amplifications des gènes mitochondriaux (Marescaux 2010, mémoire).

Gène	Amorces	Taille (Pb)	Conditions PCR (30 cycles)
Cyt b	CytB-R (5' AANAGGAARTAYCAYTCNGGYTG 3') CytB-F (5' TGTGCRGCNACYGTWATYACTAA 3') (Merritt <i>et al.</i> 1998)	± 430	94° - 4 min 94° - 45 sec 42° - 45 sec 72° - 45 sec 72° - 10 min 10° - Pause
CO I	LCO 1490 (5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') HCO 2198 (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3') (Former <i>et al.</i> 1994)	±700	94° - 4 min 94° - 45 sec 45° - 45 sec 72° - 45 sec 72° - 10 min 10° - Pause

Tableau 10: Paramètres PCR des amplifications des motifs microsatellites.

Locus microsatellites	Amorces	Conditions PCR (35 cycles)
CIA01	Annexe 12	94° - 4 min 94° - 45 sec 53° - 45 sec 72° - 45 sec 72° - 10 min 10° - Pause
CIA02	Annexe 12	
CIA03	Annexe 12	
CIB03	Annexe 12	
CIB11	Annexe 12	
CIC01	Annexe 12	
CIC08	Annexe 12	
CIC12	Annexe 12	
CID12	Annexe 12	
CIE01	Annexe 12	
CI5	F (5'-AGGCATGGGTGTTGTACG-3') R (5'-CCACTCTTGTCTAAGTTGCAG-3')	
CIB08	F (5'-AGGCATGGGTGTTGTACG-3') R (5'-GTTTCTTTTTTTATATGTTTGTT-3')	
CIG08	F (5'-ACAGGCTTGATTCTGACG-3') R (5'-ACAAGGAATAACAACCTCCA-3')	
CIF04	F(5'-CATTGTTCTGGTCATTGCT-3') R (5'-AGATCGGTTCTTTTACACA-3')	



Figure 12: Vues externe et interne de l'individu S1 du morphotype intermédiaire de la Seine.

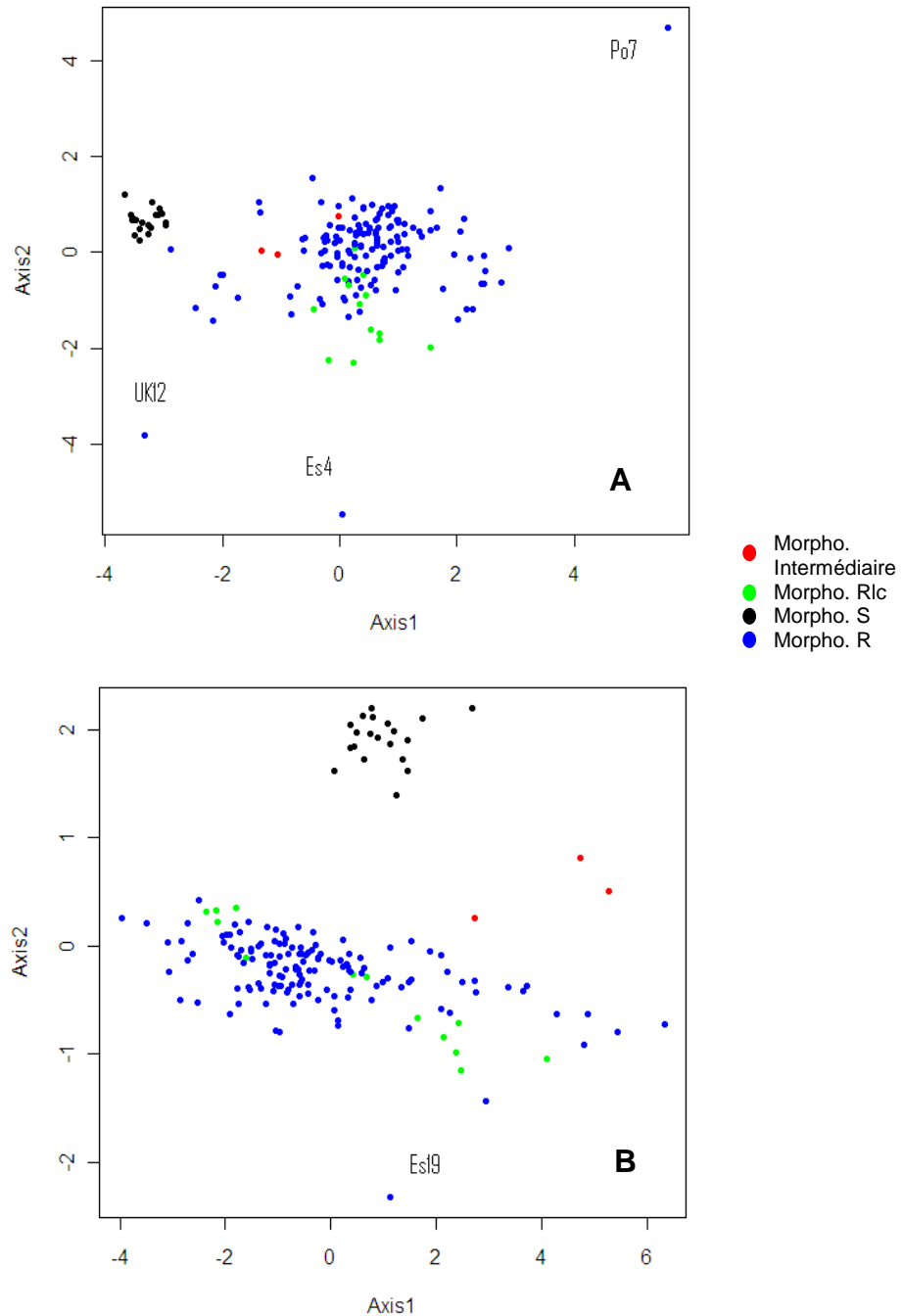


Figure 13: Résultats de l'Analyse en Composantes Principales sur les variables morphologiques des populations européennes de *Corbicula*. A. ACP sur les ratios hauteur/épaisseur, largeur/épaisseur, hauteur/largeur, nombre de stries/hauteur, B. ACP sur log(hauteur), log(largeur), log(épaisseur) et sur le ratio nombres de stries/hauteur. Chaque individu est représenté par un point distinct.

Tableau 11: Types de spermatozoïdes observés.

Population	Aflagellé	Monoflagellé	Biflagellé
Espagne	X	X	X
Portugal (Lima)	✓	✓	✓
Portugal (Minho)	✓	✓	✓
Doubs R	✓	✓	✓
Doubs Rlc	✓	✓	✓
Seine	✓	✓	✓
Saône R	X	X	X
Saône S	✓	✓	✓
Vidourle	✓	✓	✓
Royaume-Uni	✓	✓	✓
Suisse	✓	✓	✓

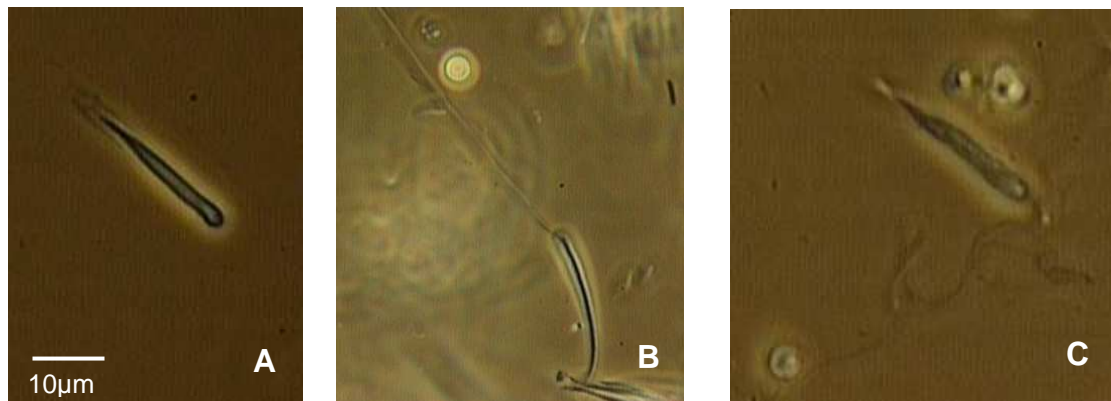


Figure 14: Morphologie des spermatozoïdes de *Corbicula*. A. Spermatozoïde aflagellé de la population Rlc du Doubs, B. Spermatozoïde monoflagellé de la population du Royaume-Uni, C. Spermatozoïde biflagellé de la population de la Seine.

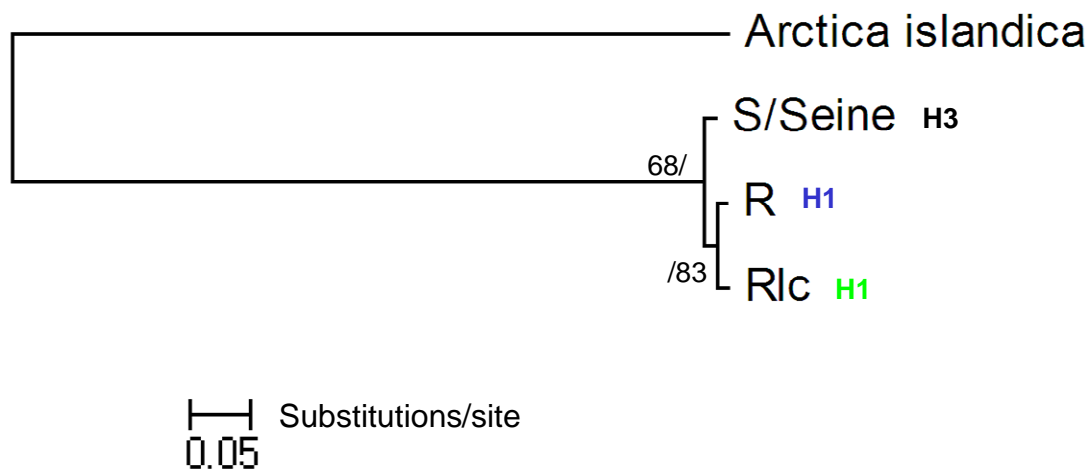


Figure 15: Phylogénie par Maximum Likelihood basée sur la séquence du gène mitochondrial Cytb (351bp). Les nombres aux nœuds indiquent pour les nombres situés au-dessus de la barre oblique, les valeurs des probabilités postérieures (BI) et pour les nombres situés en dessous de la barre obliques, les valeurs de bootstrap pour 1000 répliques (ML).

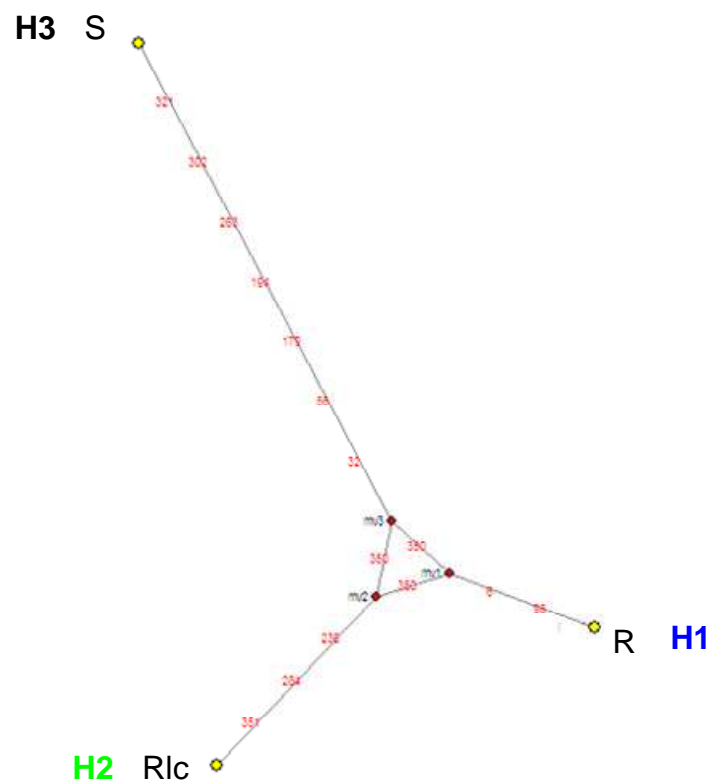
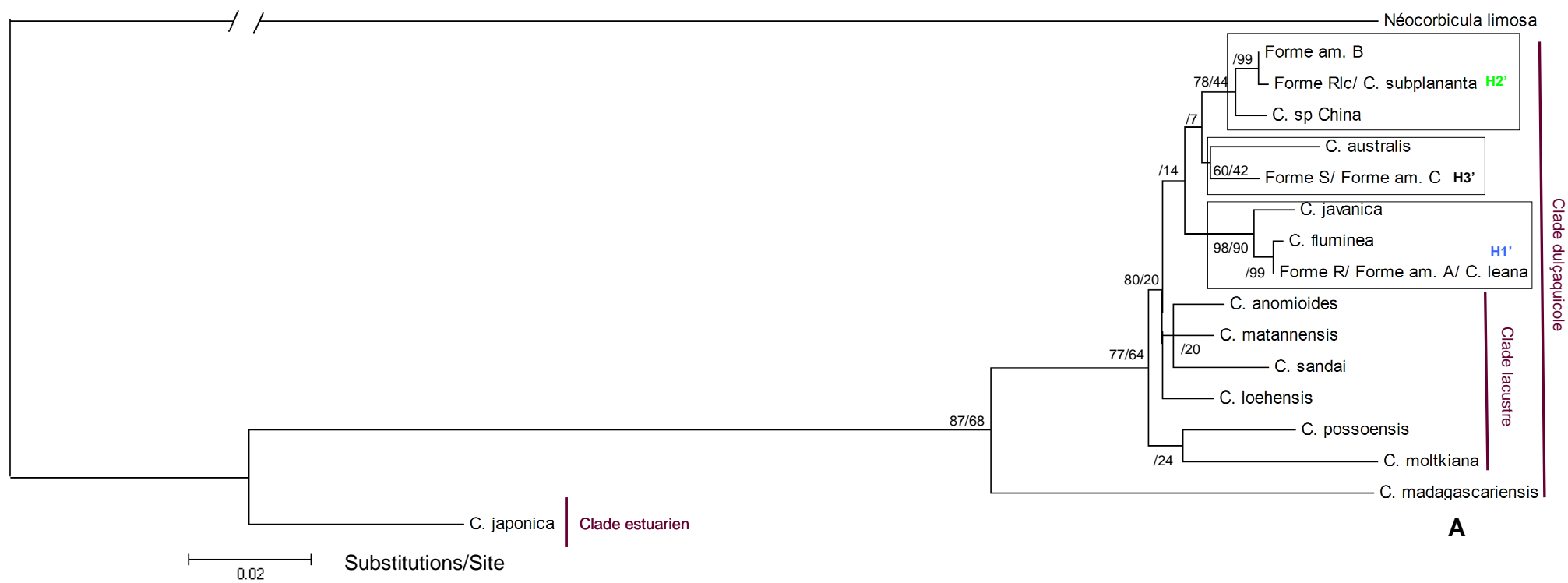


Figure 16: Réseau d'haplotype construit avec Network 4.5.1.6 à partir des séquences du gène mitochondrial Cytb. Les nombres rouges indiquent une mutation.



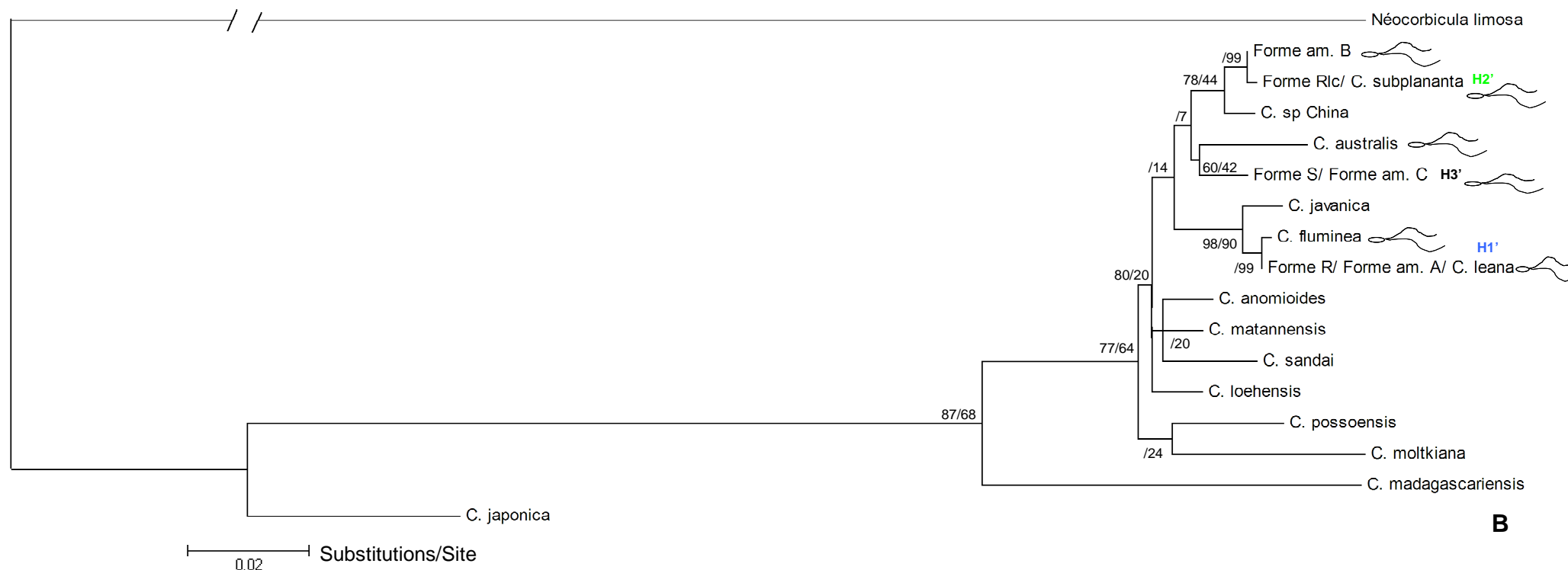


Figure 17 : A. Phylogénie par Maximum Likelihood basée sur la séquence du gène mitochondrial COI (668pb). Les nombres aux nœuds indiquent pour les nombres situés au-dessus de la barre oblique, les valeurs des probabilités postérieures (BI) et pour les nombres situés en dessous de la barre obliques, les valeurs de bootstrap pour 1000 répliques (ML), B. Même phylogénie que A, représentant les formes androgénétiques par des spermatozoaires biflagellés et les formes sexuées sans marquage (d'après Konishi *et al.* 1998, Byrne *et al.* 2001, Lee *et al.* 2005, Hedtke *et al.* 2008)

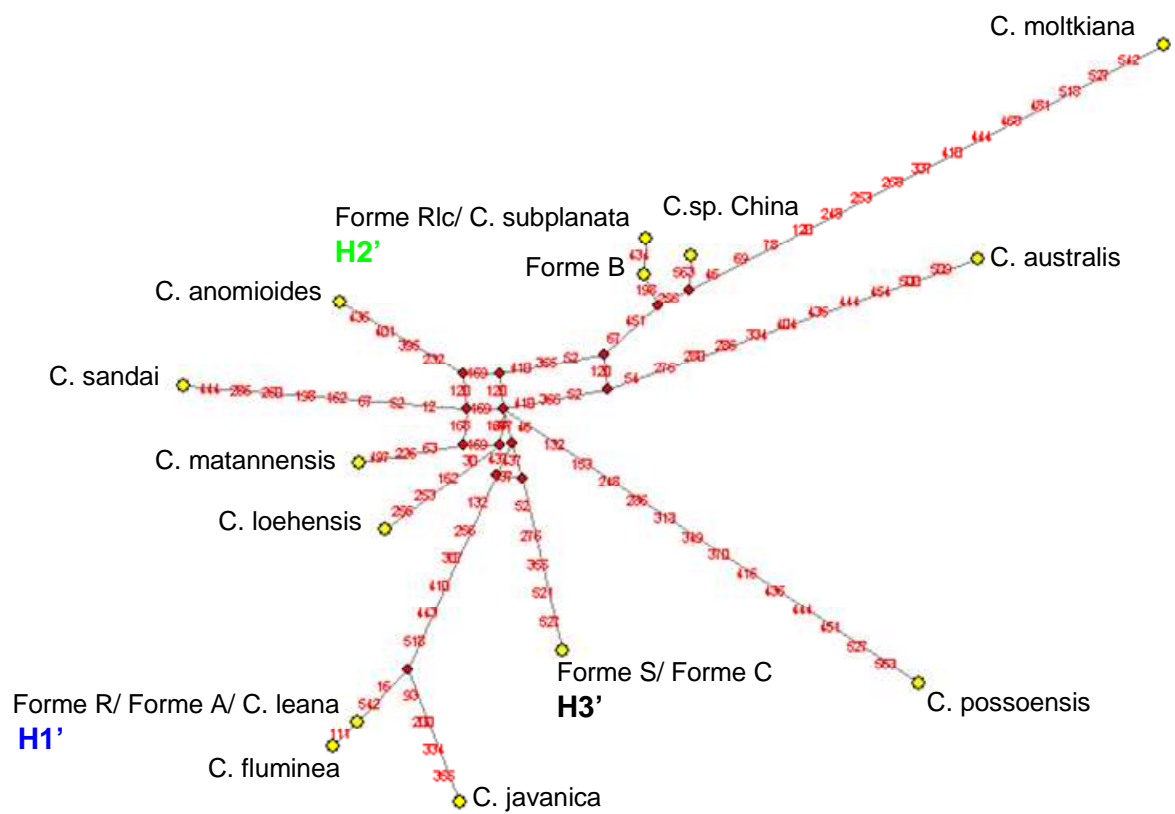


Figure 18: Réseau d'haplotype construit avec Network 4.5.1.6 à partir des séquences du gène mitochondrial COI des espèces de *Corbicula dulçaquicoles*. Les nombres en rouge indiquent une mutation.

Tableau 12: Résumé des analyses microsatellites pour *Corbicula* en Europe, utilisant 10 loci.
Les allèles en gras sont les allèles communs à tous les individus.

Locus	R	S	Rlc	Rlc/R (Gard2)	R/Rlc (Db1)	Intermédiaires Seine	Intermédiaire Uk3
CIA01	198		196	196	198	198	198
CIA02	110-114	112-116	112-116	112-116	?	109-113	114
CIA03	189-192-194		190	190	192-194		189-192-194
CIB03	233- 239	233- 239	239	239	233- 239	233- 239	233- 239
CIB11	311	311 -313	311 -313	311 -313	311	311 -313	311
CIC01	175 -179	173- 175	173- 175	173- 175	175 -179	173- 175	?
CIC08	215-219	260-305-315	303-305	?	215-219	260-305-315	216-220
CIC12	226	226-228	230	230	226	226-228	226-228
CID12	274 -278	264- 274	274	274	?	264- 274	264- 274
CIE01	213	209	213	213	213	209	209

R
 Rlc
 S

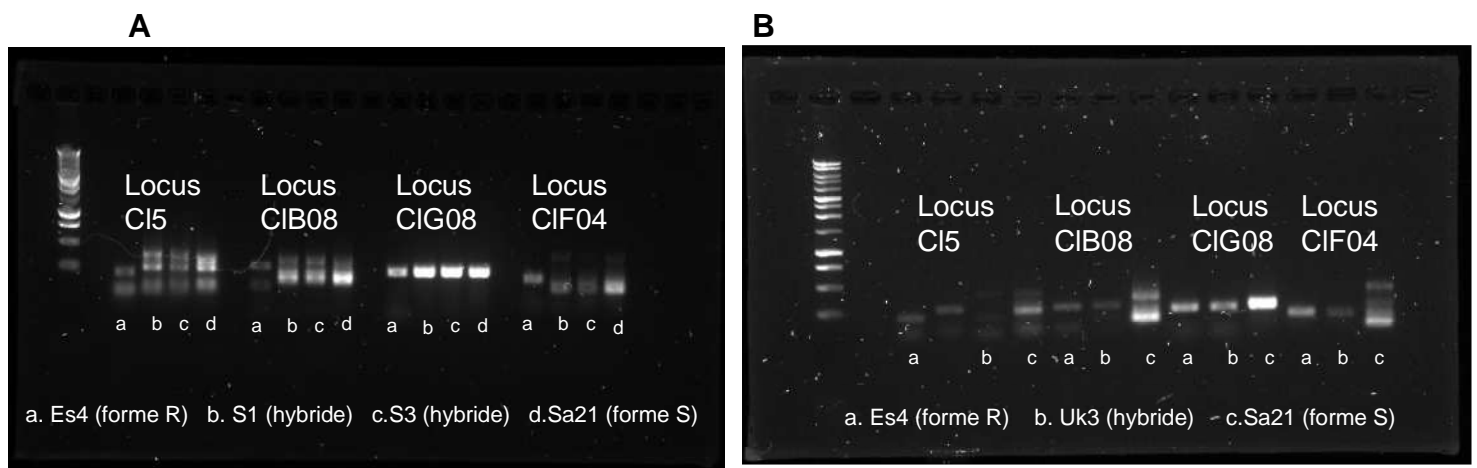


Figure 19: Comparaison entre les hybrides présumés (S1, S3 et Uk3), la forme R et la forme S pour 4 marqueurs microsatellites différents. A. Hybrides de la Seine (S1 et S3) dont le pattern sur gel est identique à celui de la forme S, B. Hybride Uk3 du Royaume-Uni dont le pattern sur gel est identique à celui de la forme R.

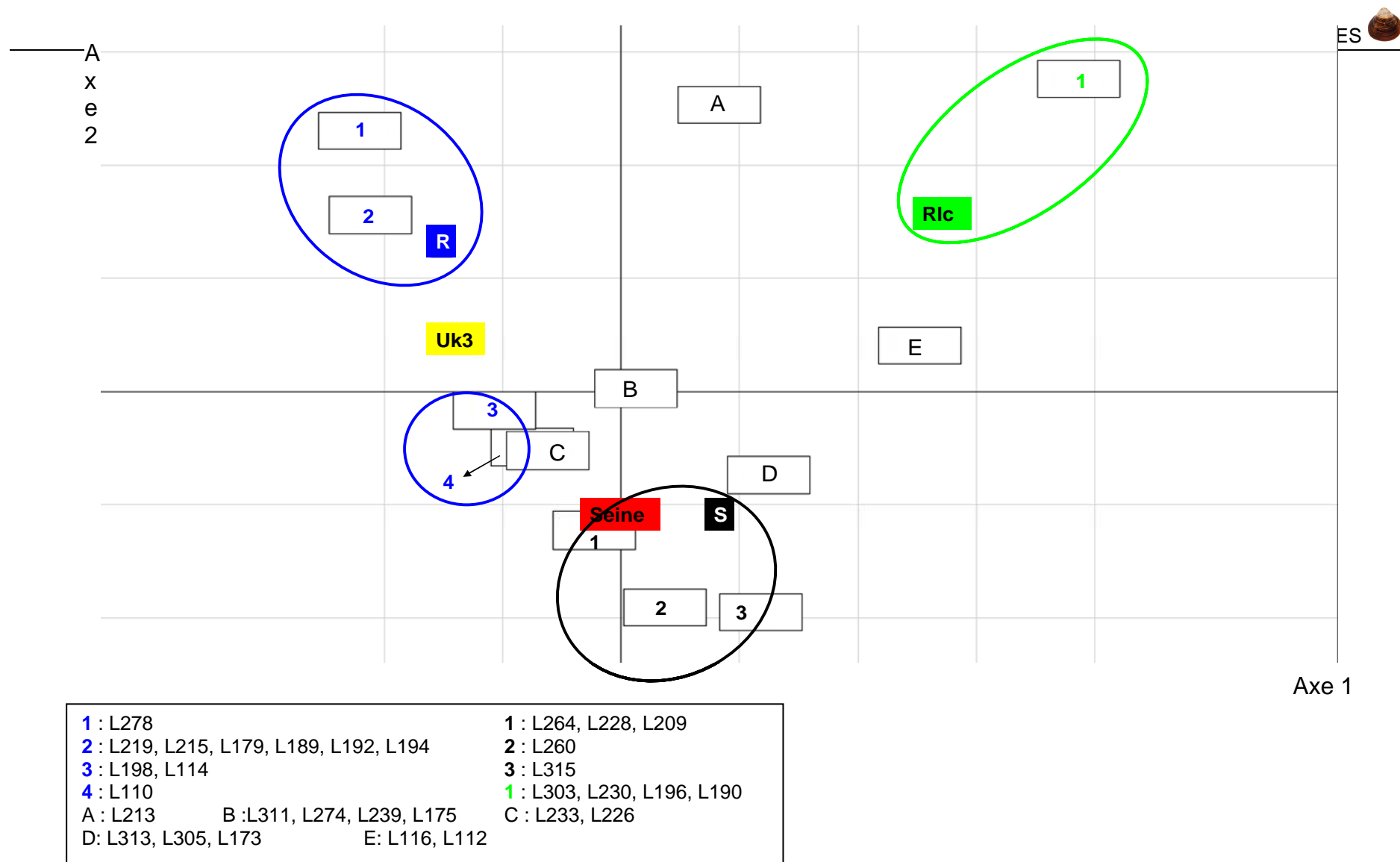


Figure 20: Plan factoriel de l'Analyse Factorielle des Correspondances. Les allèles dans les ellipses sont ceux qui permettent de discriminer la forme correspondant à la couleur dans laquelle ils sont entourés. Les lettres en majuscules indiquent les allèles non discriminants et donc communs à deux ou trois formes.

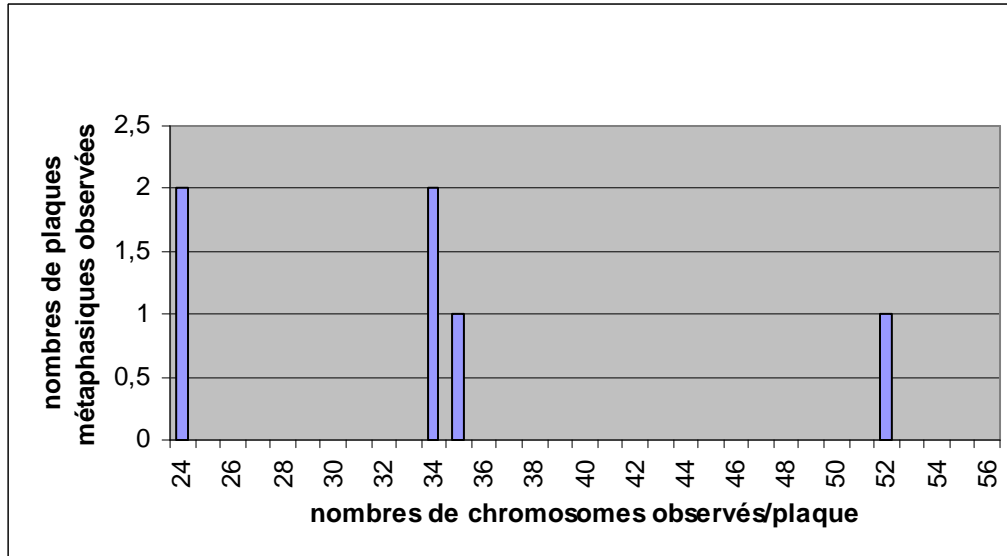


Figure 21: Résultats du caryotypage.

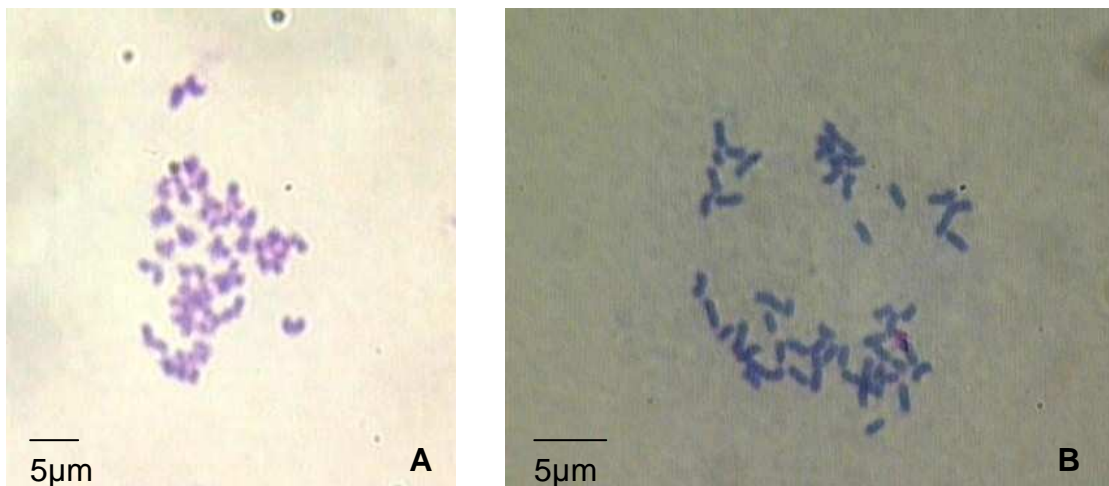


Figure 22: Métaphases de la forme R de *Corbicula* en Meuse belge. A. Diploïde (35 chromosomes), B. Triploïde (52 chromosomes).

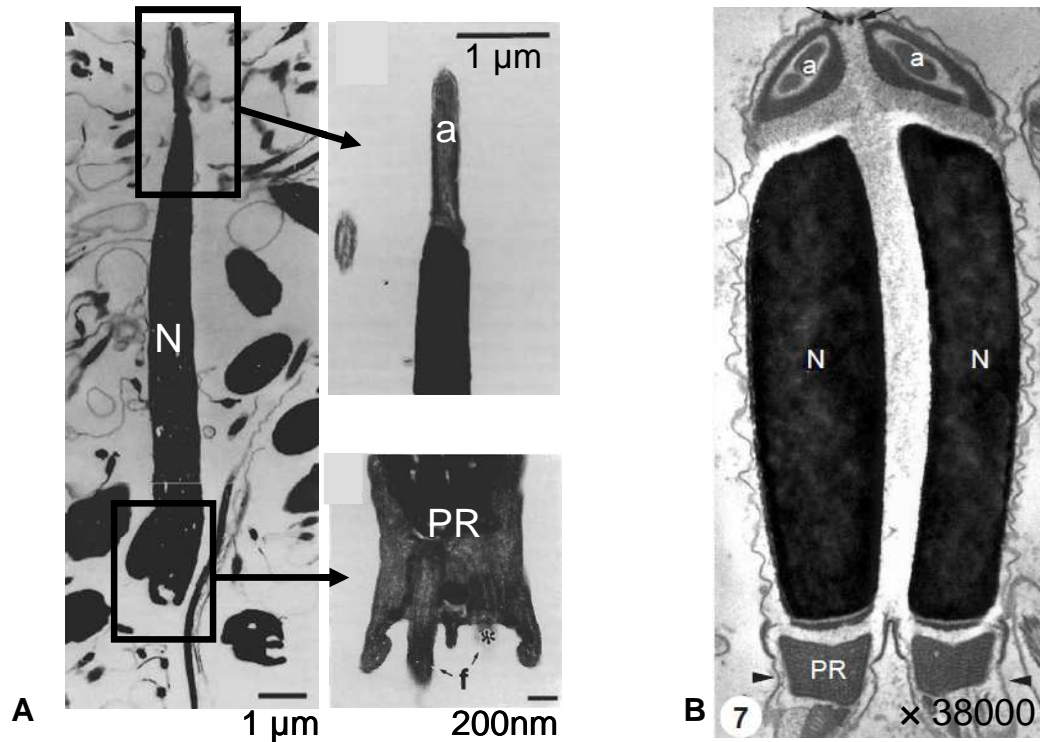


Figure 23: Comparaison entre un spermatozoïde de *Corbicula* et un spermatozoïde résultant d'un pairing. A. Spermatozoïde et détails d'un spermatozoïde de *C. fluminea* (Kornishi *et al.* 1998), B. Tête d'un spermatozoïde de *Tricholepidion gertschi* Wygodzynsky (Dallai *et al.* 2001). a. acrosome N. noyau PR. région postérieure de la tête.